

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. H.–J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. B. Kaspers

## **Charakterisierung des potenziellen Autoantigens cRALBP**

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

von  
**Albert Johann Raith**  
aus  
Freising

München 2005

Meiner Familie und Karina

Dekan : Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent : Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Tag d. mündl. Prüfung : 15. Juli 2005

1	Einleitung .....	7
2	Literatur .....	9
2.1	Equine rezidivierende Uveitis (ERU) .....	9
2.1.1	Definition .....	9
2.1.2	Klinisches Bild der ERU .....	9
2.1.3	Theorien zur Ätiologie .....	10
2.1.3.1	Intraokuläre Leptospireninfektion.....	10
2.1.3.2	Die ERU als autoimmun-bedingtes Geschehen .....	11
2.2	Autoantigene in der Uveitis.....	13
2.2.1	Identifizierung eines Autoantigens.....	13
2.2.2	Bereits beschriebene retinale Autoantigene in der Uveitis .....	14
2.2.2.1	S-Antigen (S-Ag) .....	15
2.2.2.2	Interphotorezeptor Retinoid Binding Protein (IRBP) .....	17
2.2.2.3	Experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) und experimentelle autoimmune Pinealitis (EAP).....	18
2.3	Epitop Spreading .....	19
2.4	Cellular Retinaldehyde-binding protein (cRALBP).....	21
2.4.1	Vorkommen und Funktion .....	21
2.4.2	cRALBP und retinale Dystrophien .....	22
2.4.3	cRALBP und ERU .....	25
3	Material und Methoden .....	26
3.1	Untersuchungsmaterial.....	26
3.1.1	ERU-Patienten.....	26
3.1.2	Versuchspferde.....	26
3.1.3	Klinisches Scoring nach Gerhards und Thureau.....	27
3.1.4	Versuchsratten.....	28
3.2	Puffer und Lösungen .....	28
3.2.1	Herstellung von rekombinatem cRALBP .....	28
3.2.2	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	30
3.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.2.4	Western Blot.....	32
3.2.5	Coomassiefärbung.....	33
3.2.6	Histologie .....	33
3.3	Rekombinante Herstellung von humanem cRALBP .....	34
3.3.1	Transformation .....	34
3.3.2	Induktion .....	34
3.3.3	Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen.....	35
3.3.4	Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen.....	36
3.3.5	Dialyse.....	36
3.3.6	Entfernung von Lipopolysaccharid (LPS).....	37
3.3.7	NO-Assay .....	37
3.3.8	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	38
3.4	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	38
3.4.1	Beschichten der ELISA-Platte .....	38
3.4.2	Durchführung des ELISA.....	39
3.4.3	Statistische Auswertung der Autoantikörperprävalenz .....	40
3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3.5.1	Herstellen der SDS-Polyacrylamidgele.....	40
3.5.2	Durchführung der Elektrophorese .....	41
3.5.3	Coomassiefärbung.....	41

3.5.4	Western Blot.....	41
3.5.5	Immunoblot .....	42
3.6	T-Zellproliferationsassay .....	43
3.6.1	Präparation der T-Zellen .....	44
3.6.1.1	Pferd .....	44
3.6.1.2	Ratte .....	44
3.6.2	Durchführung .....	45
3.7	Histologie .....	46
3.7.1	Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung .....	47
3.7.2	CD3-Färbung.....	48
3.7.3	Glutamin-Synthetase (GS)-Färbung.....	49
3.7.4	Glutamin Synthetase-fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP)-Färbung.....	50
3.7.5	von-Willebrand-Faktor (vWF)-Färbung .....	51
3.7.6	Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)-Färbung .....	52
3.7.7	Beurteilung der pathohistologischen Veränderungen .....	53
4	Ergebnisse .....	56
4.1	Produktion von cRALBP .....	56
4.1.1	Induktion mit IPTG .....	56
4.1.2	Proteinaufreinigung.....	57
4.1.2.1	Native Aufreinigung.....	57
4.1.2.2	Denaturierende Aufreinigung.....	58
4.1.3	Entfernung von LPS aus den Proteinlösungen.....	59
4.2	B-Zellantwort von ERU-Patienten auf cRALBP .....	60
4.2.1	Screening der Seren von ERU-Patienten im indirekten ELISA.....	60
4.2.2	Untersuchung von Glaskörperproben im indirekten ELISA.....	62
4.2.3	Epitop Spreading in der B-Zellantwort .....	63
4.3	T-Zellantwort von ERU-Patienten auf cRALBP .....	64
4.3.1	T-Zell-Proliferationsassays mit cRALBP stimuliert .....	64
4.3.2	Langzeituntersuchung der Reaktionen auf retinale Antigene .....	65
4.3.3	T-Zellproliferationsassay der immunisierten Pferde.....	67
4.4	Überprüfung der Uveitogenität von cRALBP im Ratten- und Pferdmodell .....	69
4.4.1	B-Zellantwort der immunisierten Tiere.....	70
4.4.2	Proliferation der Rattenmilzzellen .....	71
4.4.3	Histologische Ergebnisse .....	72
4.4.3.1	Ratten .....	72
4.4.3.2	Pferde .....	76
4.4.3.2.1	Pferd 1 .....	83
4.4.3.2.2	Pferd 2 .....	86
4.4.3.2.3	Pferd 3 .....	88
5	Diskussion .....	93
6	Zusammenfassung.....	105
7	Summary .....	106
8	Literaturverzeichnis.....	107

## Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid (deutsch: Aminosäure)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	Krebs assoziierte Retinopathie (engl. cancer associated retinopathy)
cGMP	zyklische Guanosin Monophosphat Phosphodiesterase
cRALBP	zelluläres Retinaldehyd bindendes Protein
EAE	experimentelle autoimmune Encephalitis
EAP	experimentelle autoimmune Pinealitis
EAU	experimentelle autoimmune Uveitis
ECL	Enhanced-chemiluminescens; verstärkte Chemilumineszens
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERU	equine rezidivierende Uveitis
et al.	et altera, und Mitarbeiter
FCA	Freund`s komplettes Adjuvans (engl. CFA: Complete Freund`s adjuvans)
FCS	fetales Kälberserum
x g	...fache Erdbeschleunigung
GFAP	Glutamin Synthetase-fibrilläres saures Gliaprotein
GK	Glaskörper
GS	Glutamin-Synthetase
HEU	experimentelle Uveitis des Pferdes (engl. horse experimental uveitis)
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein
i.v.	intravenös

kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
μ	mikro- ( $10^{-6}$ )
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MBP	Myelin-basic-protein
mBq	Megabecquerel
MG	Molekulargewicht
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histokompatibility complex)
mM	Millimolar
MS	Multiple Sklerose
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ m)
OD	Optische Dichte
P-Ag	P (particulate) –Antigen
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PBS-T	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% Tween
PLP	Myelin Proteolipid Protein
PPD	purified protein derivative of tuberculin
POD	Peroxidase
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
S-Ag	S (soluble) -Antigen
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (engl. tris buffered saline)
TBS-T	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% Tween
TEMED	NNNN´-Tetra-methylethylendiamin
TOF-Analysator	Flugzeitanalysator (engl. time of flight analysator)
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand-Faktor

# 1 Einleitung

*„Wenn ich ein mondblindes Pferd hätte, so würde ich alle diese Curen nicht gebrauchen, sondern es fortschaffen, ob schon ich nicht sagen würde, dass ich es für ein gesundes Pferd verkaufte, wie es unter den Roßhändlern gebräuchlich ist, die weder Gewissen noch Ehrliche haben.“*

*(Brackens, H.: Verbesserte Roßarzneykunst. Aus dem Englischen übers., Altenburg, 1758)*

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist die häufigste und bedeutungsvollste Augenkrankheit bei Pferden, die meist nicht nur eines sondern beide Augen befällt und zur Erblindung führt. Bis vor kurzem fielen die Symptome dieser Augenerkrankung unter die Definition des Hauptmangels „periodische Augenentzündung“. Seit 01.01.2002 wird das Pferdekaufrecht durch EU-Richtlinien geregelt. Folglich besitzt die equine rezidivierende Uveitis nach wie vor auch wirtschaftliche und forensische Bedeutung in Europa.

Während die klinischen Symptome und die unterschiedlichen Verlaufsformen der inneren Augenentzündung bereits zu Beginn des Jahrhunderts in der veterinärmedizinischen Ophthalmologie genauestens dokumentiert wurden, konnten Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung bisher noch nicht abschließend geklärt werden. Von unterschiedlichen Untersuchern wurde eine Vielzahl von infektiösen Erregern als Auslöser der ERU im Laufe der Zeit verdächtigt, konnten jedoch nur mit inkonsistentem Erfolg nachgewiesen werden. Mit den Fortschritten der immunologischen Methoden und Techniken in den letzten Jahrzehnten gelingt es jedoch immer häufiger, ein autoimmun-bedingtes Geschehen in der Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis zu beweisen.

Ausgehend von Untersuchungen zur humoralen Immunantwort von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis auf die Erkennung von retinalen Autoantigenen, bei denen Seren von ERU-Patienten cRALBP (zelluläres Retinaldehyd bindendes

Protein) detektierten, sollte dieses neu entdeckte potenzielle Autoantigen in der equinen rezidivierenden Uveitis charakterisiert werden.

## **2 Literatur**

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

#### **2.1.1 Definition**

Die equine rezidivierende Uveitis wird als endogene, nicht traumatische Uveitis charakterisiert. Sie ist als nicht granulomatöse Entzündung von Iris, Ziliarkörper, Chorioidea und benachbarten Augenstrukturen zu sehen, die rezidivierend verläuft (Werry & Gerhards 1992). Eine unbehandelte ERU kann durch progrediente Zerstörung intraokulärer Strukturen zum Verlust des Visus führen, als Endstadium ist die Phthisis bulbi zu sehen (Gerhards & Wollanke 2001).

Die Prävalenz der ERU liegt bei durchschnittlich 10 % (Gilger et al. 1999, Szemes & Gerhards 2000).

Pferde, die erblinden, weisen mit der Zeit ein hohes Gefahrenpotenzial für sich selbst und ihre Umwelt auf. Weil die meisten Pferde, die an ERU erkranken, mit der Zeit erblinden und somit früher oder später euthanasiert werden müssen, stellt diese Erkrankung auch einen wirtschaftlichen Verlust für die Pferdebesitzer dar. Nicht zu vergessen ist, dass diese Tiere auch aus tierschützerischer Sicht getötet werden sollten, da ein Fluchttier ohne Visus einem erhöhten Stress ausgesetzt ist.

#### **2.1.2 Klinisches Bild der ERU**

Das Krankheitsbild der ERU ist äußerst variabel (Spiess 1997). Nicht selten sind beide Augen betroffen. Die Tiere können eine klinisch unauffällige Entzündung entwickeln, die vom Tierbesitzer nicht bemerkt wird. Andererseits kann diese Entzündung zu heftigen Beschwerden und zu Störungen des Allgemeinbefindens mit einhergehendem Körpertemperaturanstieg bis zu 40°C führen.

Eine Abwehrtrias (Photophobie, Blepharospasmus, Lakrimation) sowie Schmerzhaftigkeit, Lidschwellung, vermehrte Wärme, eine gerötete Konjunktiva und eine diffus hauchartig grau-bläulich getrübe Hornhaut geben, mit einem vielleicht bestehenden Fibrinerguss in die vordere Augenkammer, Hinweise auf das Vorhandensein einer akuten vorderen Uveitis. Können auf der Linse Irisresiduen oder kataraktartige Veränderungen festgestellt werden, weisen diese

Befunde darauf hin, dass der Patient bereits unter einem oder mehreren Schüben gelitten hat. Jedoch können auch traumatisch bedingte Uveitiden solche Veränderungen hervorrufen.

Neben der vorderen Uveitis existiert auch eine hintere Uveitis, die jedoch ohne Schmerzsymptome verläuft, da die Chorioidea nicht sensibel innerviert ist. Ophthalmoskopisch geben membranartige Glaskörpertrübungen und Netzhautablösungen Hinweise auf eine exsudative Chorioretinitis. Scharf mit Pigment umgrenzte Narben, in denen die graue Farbe der Sklera durchscheint, weisen auf eine herdförmige Entzündung der Chorioidea hin (Gerhards & Wollanke 2001). Diese Form der Uveitis wird von den Besitzern bemerkt, weil die Tiere erblindet sind und somit zunehmend verhaltensauffällig werden.

### **2.1.3 Theorien zur Ätiologie**

Seit langer Zeit werden zur ERU die unterschiedlichsten Theorien der Ätiologie diskutiert. Bis heute halten sich zwei Theorien.

#### **2.1.3.1 Intraokuläre Leptospireninfektion**

Eine Theorie zur Ätiologie der ERU ist die intraokuläre Infektion mit *Leptospira interrogans*. Seit 1947 wurden zu dieser Hypothese einige Studien angefertigt, die alle zu dem Ergebnis kamen, dass Antikörper gegen *L. interrogans* bei ERU-Patienten sowohl im Serum als auch in Flüssigkeiten des Auges nachweisbar sind (Alexander & Keller 1990; Davidson et al. 1987; Dwyer et al. 1995; Hathaway et al. 1981; Heusser 1948; Rimpau 1947; Sillerud et al. 1987). Eine Studie jedoch konnte diese Aussage nicht unterstützen, da sie zeigte, dass die Prävalenz von Serumantikörpern gegen *L. interrogans* bei an ERU erkrankten Pferden 9%, bei gesunden Tieren jedoch 11% beträgt (Matthews et al. 1987).

Wollanke untersuchte 2001 anhand des Glaskörpermaterials von 242 an ERU erkrankten und 39 gesunden Tieren den intraokulären Antikörpertiter gegen *L. interrogans* (Wollanke et al. 2001). Zusätzlich wurde versucht, die Leptospiren aus dem Glaskörper anzuzüchten. Bei den an ERU erkrankten Pferden konnten in 52% der Fälle Leptospiren aus dem Glaskörpermaterial angezüchtet werden, 80% der Patienten wiesen einen erhöhten Antikörpertiter im Auge auf. Die Gruppe der gesunden Pferde zeigte, dass in ihren Glaskörperproben das Anzüchten von Leptospiren nicht möglich war. Auch konnten keine Antikörpertiter nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in dieser Studie der Serumantikörpertiter

gegen Leptospiren bestimmt, der aber keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden zuließ (Wollanke et al. 2001). Die Schlussfolgerung der Autorin ist, dass eine persistierende okuläre Infektion mit *L. interrogans* gemeinsam mit einer rezidivierenden Uveitis auftritt. Zusätzlich konnte sie feststellen, dass die Serumantikörper aufgrund ihres geringen Unterschiedes zwischen gesunden und erkrankten Tieren nicht als diagnostisches Hilfsmittel dienen können (Wollanke et al. 2001).

Das von einigen Autoren beschriebene Ansprechen auf cortisonhaltige Augensalben (Hines 1984; Spiess 1997; Winterberg 1997) lässt jedoch eher auf ein immunmediertes Geschehen schließen. Auch die Tatsache, dass es sich bei der ERU um eine lymphozytäre Entzündung handelt und dass diese Entzündung rekurrent ist, stützen diese These (Mair & Crispin 1989).

Neben der Theorie der intraokulären Leptospireninfektion wird daher auch ein immunbedingtes Geschehen diskutiert.

### **2.1.3.2 Die ERU als autoimmun-bedingtes Geschehen**

Die ersten Untersuchungen, ein autoimmun-bedingtes Geschehen in der ERU zu zeigen, wurden von Maxwell et al. 1991 unternommen. Er untersuchte mittels ELISA und Western-Blots die periphere B-Zellantwort von an ERU erkrankten Pferden auf S-Antigen (S-Ag) und Rhodopsin, fand aber keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und kranken Pferden (Maxwell et al. 1991). Gilger charakterisierte die T-Lymphozyten in den Augen von chronisch an ERU erkrankten Pferden und bestätigte auch die Ergebnisse von drei anderen Studien (Dubielzig et al. 1997; Kalsow et al. 1992; Romeike et al. 1998), die T-Lymphozyten ebenfalls als die vorherrschende infiltrierende Zellpopulation beschrieben (Gilger et al. 1999). Ein zellmediertes Immungeschehen gegen uveale Antigene wurde auch von Hines und Halliwell 1991 beschrieben (Hines 1984; Hines & Halliwell 1991). Genauere Untersuchungen von Gilger zeigten, dass es sich bei den in den Augen der erkrankten Pferde gefundenen T-Lymphozyten um CD4<sup>+</sup> Lymphozyten handelt. Die hohen gemessenen Konzentrationen an IL-2 und IFN- $\gamma$  und der niedrige Gehalt an IL-4 sprechen für eine Th1-Antwort. Da T-Lymphozyten auch durch mikrobielle Erreger aktiviert werden können, wurden die Gewebe daraufhin untersucht. Sowohl in dieser als

auch anderen Studien (Attenburrow 1983; Cooley et al. 1990; Dubielzig et al. 1997) wurden histologisch keine Mikroorganismen nachgewiesen. Auch die Tatsache, dass die untersuchten Pferde frei von systemischen Erkrankungen waren, ließ darauf schließen, dass es sich bei der Pathogenese der ERU um ein immunbedingtes Geschehen handelt, bei dem sich der Körper gegen eigene oder sequestrierte Antigene aus der Uvea richtet (Gilger et al. 1999).

Romeike untersuchte 1998 immunhistochemisch mit anti-MHC-II-Antikörpern die Augen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Dabei konnte sie eine deutliche Hochregulation der MHC-II Expression auf Müllerzellen in der Retina von erkrankten Pferden feststellen (Romeike et al. 1998). Auch in anderen Modellen (Chan et al. 1986a; Chan et al. 1986b; Detrick et al. 1986; Fujikawa & Haugen 1990; Kalsow et al. 1995; Kim et al. 1987; Wetzig et al. 1988) konnten die Autoren in ihren Untersuchungen zur MHC-II Expression auf Müllerzellen eine Hochregulation in pathologisch veränderten Bereichen erkennen.

Deeg et al. (2002) untersuchte 27 Augen von 20 ERU-Pferden und 30 Augen von 15 Kontrollpferden sowohl histologisch als auch immunhistologisch auf Veränderungen im Zusammenhang mit dem Auftreten der spontanen ERU (Deeg et al. 2002a). In klinisch geringgradig erkrankten Augen konnte dabei ebenfalls eine hohe Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, deren höchste Konzentration sich in der Nähe der retinalen Gefäße zeigte. Da die Retina des Pferdes lediglich in der Nähe des N. opticus eine hohe Anzahl an Gefäßen aufweist, ist bislang unklar, wie T-Lymphozyten auch in nicht-vaskularisiertes Gewebe vordringen können. Sie können entweder aus den retinalen Gefäßen in die nicht-vaskularisierten Gebiete migrieren oder stammen aus der subretinal gelegenen stark vaskularisierten Chorioidea. Da in dieser Studie auch CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der Chorioidea gefunden wurden, spricht dies für die zweite Hypothese. In klinisch stärker betroffenen Augen wurden zusätzlich subretinal Makrophageninfiltrationen gefunden. Diese Makrophagen enthielten phagozytiertes Pigment. Diese Beobachtungen stimmen mit denen bei mit S-Antigen immunisierten Ratten (Liversidge & Forrester 1988) oder mit Interphotorezeptor Retinoid Binding Protein (IRBP) immunisierten Ratten überein (Gery et al. 1986b). Die ersten Anzeichen einer Gewebeerstörung bei ERU-Pferden findet man im Außensegment der Photorezeptoren. Auch dies konnte in anderen Tiermodellen der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU)

nachgewiesen werden (Caspi et al. 1988; Wacker et al. 1977). Als nächster Schritt der Pathologie konnte die Zerstörung der inneren Körnerschicht gezeigt werden. Die äußere Körnerschicht bleibt zunächst unversehrt. Diese Beobachtung entspricht allerdings nicht denen aus den bereits bekannten EAU-Modellen, bei denen zuerst die äußere Körnerschicht zerstört wird (de Smet et al. 1993). Interessanterweise konnten in vielen Augen, auch in geringgradig betroffenen, lymphoide Follikel besonders im Irisstroma aber auch in anderen Bereichen des Auges gefunden werden. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits durchgeführte Studie von Dubielzig, der diese lymphoiden Follikel ebenfalls im Pferdeauge zeigen konnte (Dubielzig et al. 1997). Immunhistochemisch wiesen die Follikel im Zentrum  $CD3^+$  Zellen auf, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um B-Zellen handelt. In der Peripherie konnte eine große Anzahl  $CD3^+$  T-Zellen nachgewiesen werden. Je heftiger die klinische Erscheinung war, desto mehr lymphoide Follikel konnten im Ziliarkörper und auch in der Chorioidea nachgewiesen werden (Deeg et al. 2002a). Diese Befunde zeigen sich ebenfalls in der mit IRBP induzierten EAU der Ratte (Caspi et al. 1988) und in Primaten (Hirose et al. 1986) jedoch nicht im S-Ag-Modell.

Deeg (2001) untersuchte die Zellen aus Glaskörperproben von vitrektomierten Pferden und die peripheren Blutlymphozyten (PBLs) von ERU-Patienten und gesunden Pferden. Dabei wurde unter anderem mittels T-Zellproliferationsassays nach T-Lymphozyten gesucht, die nach Kontakt mit den bereits beschriebenen retinalen Autoantigenen S-Ag oder Interphotorezeptor Retinoid Binding Protein (IRBP) proliferierten. Zellen, die aus dem Glaskörper gewonnen werden konnten, reagierten in einem deutlich höheren Maß als die PBLs. Des Weiteren konnte durch die Analyse der Leukozyteninfiltrate gezeigt werden, dass über 90% der Zellen darin aus Lymphozyten bestand, von denen wiederum 57% als  $CD4^+$  Zellen mittels Durchflusszytometrie charakterisiert werden konnten (Deeg et al. 2001).

## **2.2 Autoantigene in der Uveitis**

### **2.2.1 Identifizierung eines Autoantigens**

Jedes Molekül, das von Antikörpern oder T-Zellrezeptoren erkannt wird, kann als Antigen beschrieben werden (Roitt 2000). Werden körpereigene Moleküle von

Antikörpern oder T-Zellrezeptoren erkannt, dann bezeichnet man diese als Autoantigene (Tizard 2000).

Eine Methode, bisher unbekannte Autoantigene zu finden, sind zweidimensionale Immunoblots. Dazu wird Protein des Ziel-Gewebes elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit antikörperhaltigen Flüssigkeiten inkubiert. Kann dabei im Vergleich zu einer Gesundheitskontrolle ein neuer Spot markiert werden, kann dieser mittels Massenspektrometrie genauer bestimmt werden.

Die Charakterisierung des Autoantigens erfolgte dann mittels der Postulate von Witebsky (Witebsky et al. 1957) die von Rosa und Bona modifiziert wurden (Rose & Bona 1993).

Die Voraussetzungen, ein potenzielles Autoantigen als ein definitives zu bezeichnen, liegen in der Erfüllung dieser Postulate. Das erste Postulat fordert, dass gegen das Antigen Antikörper und/oder eine zelluläre Immunantwort vorliegen. Zweitens muss das zu charakterisierende potenzielle Autoantigen bekannt sein. Löst das Antigen dann nach Immunisierung das Krankheitsbild aus, wird dies als indirekter Beweis gewertet und das Autoantigen gilt als identifiziert.

### **2.2.2 Bereits beschriebene retinale Autoantigene in der Uveitis**

Seit langer Zeit wurde versucht, mit potenziellen Autoantigenen Uveitis in verschiedenen Tiermodellen zu induzieren, jedoch gelang es erst Wacker und Lipton 1965 mittels systemischer Applikation von homologem Retinagewebe in komplettem Freund's Adjuvans (FCA) eine Uveitis in Meerschweinchen zu induzieren, die sie als Experimentelle Allergische Uveitis (EAU) bezeichnen (Wacker & Lipton 1965).

Bis heute wurden sechs retinale Autoantigene in verschiedenen Tiermodellen charakterisiert.

Wacker und Lipton erhielten durch die Separation von Retinahomogenat zwei Fraktionen, eine lösliche (soluble: S-Antigen) und eine unlösliche (particulate: P-Antigen) (Wacker & Lipton 1968a; Wacker & Lipton 1968b). Die Immunisierung von Meerschweinchen mit P-Antigen zeigte zwar eine Antikörperbildung, führte aber nicht zu einer zellulären Immunantwort und nicht zu einer Uveitis (Wacker & Lipton 1968a; Wacker & Lipton 1968b). 1980 konnte mittels spezifischen

Antiseren gezeigt werden, dass P-Antigen und Rhodopsin identisch sind (Marak et al. 1980).

Die Uveitogenität von Phosduzin wurde in der Lewisratte untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Phosduzin als retinales Autoantigen eher eine untergeordnete Rolle spielt. Es konnte zwar eine Uveitis in der Lewisratte induziert werden, jedoch setzten die klinischen Veränderungen später ein und die klinischen wie auch histologischen Veränderungen zeigten nicht denselben pathologischen Erfolg wie in der S-Ag induzierten Uveitis (Dua et al. 1992).

Patienten, die an einem Bronchialkarzinom erkrankt sind, leiden sehr häufig an progredienten Sehstörungen. Dieses paraneoplastische Syndrom wird als „cancer-associated Retinopathy“ (CAR) bezeichnet. Bei Untersuchungen mit Antiseren von Humanpatienten, die an der CAR leiden, wurde Recoverin als CAR Autoantigen entdeckt (Polans et al. 1993). Im Anschluss daran wurden Lewisratten mit verschiedenen Dosen Recoverin immunisiert und entwickelten eine Uveitis, die der durch S-Antigen induzierten Uveitis glich (Adamus et al. 1994; Gery et al. 1994). Vergleiche mit pathologisch veränderten Retinae von Menschen, die an CAR litten, ließen jedoch nur zum Teil Übereinstimmungen mit den Retinae aus den Lewisratten zu (Adamus et al. 1994). Somit konnte zwar kein Modell für die CAR gefunden werden, jedoch die Uveitogenität von Recoverin gezeigt werden.

Zyklische Guanosin Monophosphat Phosphodiesterase (cGMP Phosphodiesterase) wurde 1977 von Faure als uveitogen charakterisiert (Faure et al. 1977). Die Immunisierung von Meerschweinchen führte zur Ausbildung einer experimentellen autoimmunen Uveitis (Gery et al. 1986a). Die Immunisierung von Lewisratten mit einer bakteriell exprimierten  $\gamma$ -Untereinheit der cGMP Phosphodiesterase konnte diese Ergebnisse bestätigen (Ren et al. 1996).

Im Folgenden soll auf die zwei bereits beschriebenen Autoantigene in der ERU, S-Antigen und Interphotorezeptor Retinoid Binding Protein (IRBP), eingegangen werden.

### **2.2.2.1 S-Antigen (S-Ag)**

Die Untersuchungen von Wacker 1977 zeigten, dass dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Shinohara et al. 1987) innerhalb der Retina selektiv in der Schicht der Photorezeptoren lokalisiert ist (Wacker et al. 1977). In

den Jahren 1977 und 1978 konnten Kalsow und Wacker darüber hinaus beweisen, dass S-Ag zusätzlich in der Pinealdrüse exprimiert wird. Sie waren es auch, die die Beteiligung der Pinealdrüse an der EAU zeigten (Kalsow & Wacker 1977; Kalsow & Wacker 1978).

Die funktionellen Aufgaben von S-Ag sind noch immer nicht ganz geklärt. Nachdem S-Antigen als ein wichtiges Protein der Photorezeptorzelle identifiziert worden war (Kuhn 1984), konnten weiterführende Untersuchungen zeigen, dass S-Antigen lichtabhängig an phosphoryliertes Rhodopsin bindet (Wilden et al. 1986) und die Aktivität von zyklischer Guanosin Monophosphat Phosphodiesterase unterdrückt (Buzdygon et al. 1985).

Neben seinen physiologischen Aufgaben ist es möglich, S-Antigen als Antigen zur Induktion der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) in der Ratte zu benutzen (Gery et al. 1986a). Die EAU wird durch aktivierte, antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen mediiert (Mochizuki et al. 1985) und kann durch unterschiedliche aus dem S-Antigen-Protein gewonnene Peptide induziert werden (Gregerson et al. 1987; Hirose et al. 1989; Kotake et al. 1991). Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die T-Zellantwort auf S-Antigen im Menschen, konnten jedoch keine befriedigenden Ergebnisse zeigen (de Smet et al. 1990; Doekes et al. 1987; Yamamoto et al. 1993).

Hines versuchte 1990 Ponys mit S-Antigen zu immunisieren, um eine Uveitis zu induzieren, konnte dies jedoch nicht erreichen (Hines et al. 1990).

Auch Untersuchungen zur T-Zellantwort von Lymphozyten aus dem Glaskörper und aus PBLs von an ERU erkrankten Pferden auf S-Antigen fanden bereits statt (Deeg et al. 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten aus dem Glaskörper hohe Stimulationindizes auf Peptide von S-Ag aufwiesen. Diese Ergebnisse gaben den Anlass, den gescheiterten Versuch von Hines zu wiederholen, indem man zusammen mit dem in FCA emulgierten S-Antigen *Bordetella pertussis* i.v. applizierte, um die Immunantwort sicher in Richtung Th1 zu treiben. Außerdem wurde ein anderer genetischer Hintergrund verwendet. Hines immunisierte Ponies, in diesem Versuch wurden Warmblutpferde verwendet. Die ausgeführte Studie zur Ermittlung der Fähigkeit, eine Uveitis mit S-Ag zu induzieren, lieferte jedoch wieder keine befriedigenden Ergebnisse, da nur eines der fünf immunisierten Pferde eine Uveitis entwickelte, die fulminant verlief, aber nicht reinduzierbar war (Deeg et al. 2004). Die Ergebnisse von Hines

und die Ergebnisse aus dieser Untersuchung unterstützen die Aussage, dass S-Antigen nur ein schwaches Autoantigen im Pferd darstellt und nur eine kleine Rolle in der Pathogenese der ERU spielt.

### 2.2.2.2 Interphotorezeptor Retinoid Binding Protein (IRBP)

Das ungefähr 140 kDa große IRBP (Chader & Wiggert 1984) kann in großer Menge im Interphotorezeptorraum der Retina lokalisiert werden. Eine geringe Konzentration dieses Proteins kann in der Pinealdrüse und der Gehirnrinde nachgewiesen werden (Gery et al. 1986b). Seine physiologische Funktion zeigt sich als Transportmolekül von Vitamin A zwischen dem retinalen Pigmentepithel und den Photorezeptoren (Kotake et al. 1991).

In den von Redmond 1985 durchgeführten Studien zur Isolierung und Charakterisierung von IRBP (Redmond et al. 1985) konnte dieses Protein nochmals genauer beschrieben werden. Auf diesen Studien aufbauend wurde das uveitogene Potenzial in der Lewisratte 1986 durch die Injektion von IRBP in FCA gezeigt (Gery et al. 1986a). Auch in anderen Tiermodellen konnte das uveitogene Potenzial gezeigt werden. Die Uveitogenität von IRBP in Kaninchen (Eisenfeld et al. 1987), Mäusen (Caspi et al. 1988) und Affen (Hirose et al. 1986) ist gesichert.

2001 wurde in einer Studie die Immunantwort auf potenzielle retinale Autoantigene in der ERU untersucht. Die T-Zellantwort von Lymphozyten aus dem Glaskörper erkrankter Pferde wiesen dabei so hohe Stimulationindizes auf IRBP Peptide auf (Deeg et al. 2001), dass die Vermutung nahe lag, dass IRBP ein hohes uveitogenes Potenzial in der Uveitis hat. Deshalb wurden Pferde mit IRBP in FCA und mit *Bordetella pertussis* i.v. immunisiert. Auf diese Weise konnte ein neues Tiermodell in der Uveitis, die **horse experimental uveitis (HEU)**, etabliert werden (Deeg et al. 2002b). Dazu wurde Pferden IRBP in FCA s.c. und *Bordetella pertussis* i.v. appliziert. An den Tagen sechs oder sieben nach der zweiten Immunisierung zeigten alle Pferde eine beginnende Uveitis. Die klinischen Symptome (Schmerzmiosis, Hypopyon, Keratitis, Glaskörpertrübung) blieben vier bis fünf Tage konstant, ehe sie wieder zurückgingen. An Tag 16 konnten keine Anzeichen einer bestehenden intraokulären Entzündung mehr gezeigt werden. Im Gegensatz zum Lewisrattenmodell kann beim Pferd die Uveitis durch erneute Gabe von IRBP reinduziert werden. Sechs bis sieben Tage

nach einer wiederholten Autoantigeninjektion zeigen sich wieder klinische Anzeichen einer inneren Augenentzündung. In einem von sieben Fällen trat ein spontanes Rezidiv ohne vorherige erneute Injektion von IRBP auf.

Pathohistologische Untersuchungen zeigten in allen Augen eine Zerstörung der retinalen Architektur und Bildung von lymphfollikelartigen Strukturen im Ziliarkörperstroma. Diese so genannten „Granulome“ findet man auch in der IRBP-Uveitis der Lewisratte, jedoch nicht in der S-Ag-Uveitis. Zusätzlich konnten massive zelluläre Infiltrationen in der Nähe der Ora serrata und peripapilläre Ansammlung von Entzündungszellen nachgewiesen werden. Die Mehrheit der Entzündungszellen wurde als T-Zellen charakterisiert.

Als Besonderheit der HEU kann die bereits angesprochene Reinduzierbarkeit genannt werden, da die anderen Tiermodelle der EAU stets monophasisch verlaufen. Von Bedeutung ist diese Tatsache für die genaue Studie der Pathogenese von Uveitiden und die Erprobung von Therapieansätzen (Deeg et al. 2002b).

### **2.2.2.3 Experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) und experimentelle autoimmune Pinealitis (EAP)**

Die Immunisierung von Tieren mit retinalen Autoantigenen induziert eine autoimmune Entzündung der Uvea und der Pinealdrüse, welche viele Antigene mit der Retina gemeinsam hat, die in das Geschehen der experimentellen autoimmunen Uveitis miteinbezogen sind (Caspi et al. 1986; Chader 1989; Chan et al. 1988; Gery et al. 1986a; Gery et al. 1986b; Kalsow & Wacker 1977; Kalsow & Wacker 1978; Mochizuki et al. 1985; Nussenblatt 1991). Beide, die EAU und die EAP, sind T-Zell mediierte und durch adoptiven Transfer von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen transferierbare Modelle autoimmuner Erkrankungen (Caspi et al. 1986; Chan et al. 1990; Gery et al. 1986a; Gery et al. 1986b; Mochizuki et al. 1985).

1999 untersuchte Kalsow aufgrund dieser Ergebnisse die Pinealdrüsen von zehn an ERU erkrankten und 13 gesunden Pferden sowohl histologisch als auch immunhistologisch. Dabei wiesen die Pinealdrüsen von Uveitispatienten eine Hochregulierung der MHC-II Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen auf. T-Lymphozyten und eine gesteigerte Kollagenablagerung konnten ebenfalls

nachgewiesen werden. Diese Veränderungen konnten in den Pinealdrüsen der Kontrollpferde nicht nachgewiesen werden. B-Lymphozyten konnten lediglich in einer Pinealdrüse nachgewiesen werden. Dabei waren die B- und T-Lymphozyten in Follikeln angeordnet, wie sie auch im Ziliarkörper von EAU-Mäusen und ERU-Pferden beschrieben sind (Caspi et al. 1988; Deeg et al. 2002a; Deeg et al. 2002b). Diese Befunde zeigen eine Beschränkung der Entzündung auf die Gebiete, die uveale Antigene exprimieren. (Kalsow et al. 1999).

## 2.3 Epitop Spreading

Der rezidivierende Charakter einer Autoimmunerkrankung konnte lange Zeit nicht erklärt werden. Eine mitunter diskutierte Hypothese für die Rekurrenz der Schübe ist das Phänomen des Epitop Spreading. Es wird als erworbene T-Zell Neoreaktivität bezeichnet und dadurch hervorgerufen, dass während der Zerstörung eines Gewebes bei einer Entzündung, neue kryptische Epitope den infiltrierenden Zellen des Immunsystems präsentiert werden (Tuohy et al. 1994; Vanderlugt & Miller 1996).

Das Phänomen des Epitop Spreading wird sowohl intramolekular als auch intermolekular beobachtet, was bedeutet, dass die neuen kryptischen Epitope aus dem bereits angegriffenen Protein (intramolekular) bzw. aus einem neuen Protein (intermolekular) rekrutiert werden.

Der erste gesicherte Bericht über intramolekulares Epitop Spreading wurde von McCarron veröffentlicht, in dem er zeigte, dass (SJLxPL)<sub>F1</sub> Mäuse, die mittels adoptiven Transfers T-Zellen aus (SJLxPL)<sub>F1</sub> Mäusen erhielten, die mit den MPB (Myelin basic protein)-Peptiden p1-37 immunisiert worden waren, eine auf MHC-II beschränkte Immunantwort auf die MPB-Peptide p89-169 während eines neuen Schubes zeigten, die im Verlauf des ersten Schubs noch nicht erkannt wurden (McCarron et al. 1990).

Lehmann konnte 1992 diese Entdeckung noch weiter ausbauen, indem er herausfand, dass sich die T-Zellantwort in (SJLxPL)<sub>F1</sub> Mäusen während der induktiven Phase auf das induzierende immunodominante MBP-Peptid p1-11 beschränkt, während sich die T-Zellantwort in den folgenden Schüben auch auf die kryptischen MBP-Peptide p35-47, p81-100 und p121-140 ausweitete (Lehmann et al. 1992). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das beobachtete

Epitop Spreading nicht nur auftrat, wenn man mit dem kompletten Protein MBP immunisierte, sondern auch, wenn man nur mit dem Peptid p1-11 immunisierte (Lehmann et al. 1992).

Intermolekulares Epitop Spreading wurde von Perry 1991 beschrieben, der eine positive T-Zellantwort auf Myelin Proteolipid Protein (PLP) während eines Schubes der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) messen konnte, nachdem (SJLxPL)F<sub>1</sub> Mäuse mit MBP immunisiert worden waren (Perry et al. 1991).

Die Pathogenität des intermolekularen Spreadings wurde 1993 von Cross et al. bewiesen. Ihnen gelang es, die EAE mittels adoptiven Transfers auf gesunde Donortiere zu transferieren. Dazu wurden Mäuse mit dem immunodominanten Peptid MBP p87-99 immunisiert und entwickelten eine EAE. Danach wurden diesen Tieren Milzzellen entnommen, die daran anschließend mit dem Peptid PLP 139-151 stimuliert wurden. Beim Transfer dieser Zellen in gesunde Tiere konnte eine EAE ausgelöst werden (Cross et al. 1993).

Die Theorie des Epitop Spreading lässt auf einen möglichen Therapieansatz schließen, indem man davon ausgeht, dass die Rekrutierung neuer kryptischer Autoantigene einer Hierarchie folgt, die durch unterschiedliche Ansätze gestoppt werden kann. So wurde bereits gezeigt, dass der Fortschritt einer durch PLP 139-151 induzierten EAE durch Toleranzinduktion gegen das komplette PLP nach dem ersten Schub gestoppt werden konnte. Die Toleranzinduktion verhinderte die Entwicklung einer, gegen das in der Kaskade folgende enzephalitogene PLP 178-191, neuen Autoreaktivität. Dadurch wurde nicht nur die Beteiligung von Epitop Spreading an der Pathogenität der EAE gezeigt, sondern auch eine Möglichkeit beschrieben, wie man therapeutisch gegen das Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen vorgehen kann (McRae et al. 1995). Auch eine weitere Untersuchung konnte dieses Ergebnis bestätigen (Vanderlugt et al. 2000).

Eine andere Möglichkeit, in das Fortschreiten der Entzündung einzugreifen, besteht darin, die für die T-Zellaktivierung und damit für das Epitop Spreading verantwortlichen und notwendigen Co-Faktoren zu blockieren. Eine kurzfristige Blockade von CD28-CD80 Molekülen konnte so zum Beispiel das Auftreten von Rezidiven bei der EAE der Mäuse deutlich verringern (Miller et al. 1995).

Auch in der durch IRBP induzierten Uveitis des Pferdes konnte bereits deutlich sowohl intra- als auch intermolekulares Spreading gezeigt werden. Die mit IRBP

immunisierten Pferde wiesen nicht nur eine positive T-Zellantwort auf die unterschiedlichen IRBP-Peptide auf, sondern auch auf Peptide des S-Antigens (Deeg et al. 2002b).

Bei den spontanen Erkrankungen Multiple Sklerose, der humanen Uveitis (de Smet et al. 2001) und bei Typ-I Diabetes (Hoppu et al. 2004; Ott et al. 2004) konnte Epitop Spreading ebenfalls nachgewiesen werden.

## **2.4 Cellular Retinaldehyde-binding protein (cRALBP)**

### **2.4.1 Vorkommen und Funktion**

cRALBP, ein retinaspezifisches Protein, wurde 1977 das erste Mal in der bovinen Retina entdeckt, als es mit radioaktiv markiertem 11-cis-Retinal Komplexe bildete (Futerman et al. 1977). Im Weiteren wurde es aus der bovinen Retina gereinigt, wobei gezeigt werden konnte, dass es endogene Liganden trägt (Stubbs et al. 1979). Struktur- und Funktionsanalysen zur bovinen Retina konnten zeigen, dass diese endogenen Liganden mit retinalem Pigmentepithel (RPE) und neuronaler Retina assoziiert sind (Saari et al. 1982). In ihrer Arbeit von 1983 zeigen Bunt-Milam und Saari mittels immunhistochemischen Methoden die Lokalisation von cRALBP (Bunt-Milam & Saari 1983). Demzufolge wird cRALBP von Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) und Müller-Gliazellen exprimiert. Auch in der Pinealdrüse konnte cRALBP nachgewiesen werden (Crabb et al. 1998).

Die Funktion des Proteins cRALBP wurde bislang mit dem Vorgang der Phototransduktion, das heißt der Umsetzung eines optischen Reizes in die Erregung neuronaler Elemente in Verbindung gebracht. In den Membranscheibchen der Stäbchen befindet sich als Sehfärbstoff Rhodopsin, das aus dem Glykoprotein Opsin und der chromophoren Gruppe des Retinals aufgebaut ist. Trifft Licht als adäquater Reiz auf den Sehfärbstoff, werden die ankommenden Photonen absorbiert. Das Retinal wechselt dadurch innerhalb von Picosekunden aufgrund eines Energietransfers von der 11-cis in die trans-Form. Über mehrere Zwischenreaktionen entsteht letztendlich nach wenigen Millisekunden das Metarhodopsin II. Die Strukturänderung im Sehfärbstoffmolekül löst eine Signalkaskade unter Vermittlung eines G-Proteins (Transduzin) aus. Dieser Verstärkungseffekt erfolgt indirekt über den intrazellulären Überträgerstoff cGMP, das die Natrium- und Calciumkanäle in der Zellmembran in Ruhe, also im

Dunklen, offen hält und somit eine Depolarisation bewirkt. Bei Lichteinfall wird das Transduzin unter Mitwirkung von GTP aktiviert und cGMP zu 5`GMP hydrolysiert. Dadurch werden die Natrium- und Calciumkanäle geschlossen, so dass es an der Zellmembran zu einer Hyperpolarisation mit verringerter Transmitterfreisetzung kommt. Eine Natrium-Calcium-Austauschpumpe führt anschließend zu einer Verringerung der intrazellulären Calciumkonzentration. Über vermehrte Synthese von cGMP wird die Depolarisation wieder eingeleitet. Die chromophore Gruppe von Rhodopsin in den Stäbchen und den Sehfärbstoffen der Zapfen, 11-cis-Retinal, wird nach dessen Photoisomerisation durch einen komplexen Prozess, der visual cycle genannt wird, regeneriert (Dowling 1960; Wald 1968). Obwohl der visual cycle der Zapfen schlechter verstanden wird, legen neuere Untersuchungen von 11-cis-retinal in den von Zapfen beherrschten Abschnitten der Retina den Verdacht nahe, dass Müller Gliazellen und das von ihnen exprimierte cRALBP an der Regeneration der Zapfenfarbstoffe beteiligt sind (Crabb et al. 1988; Intres et al. 1994; Mata et al. 2002; Sparkes et al. 1992).

Ein zusätzlicher Hinweis auf die Beteiligung von cRALBP an der Regeneration von 11-cis-Retinal lieferte eine Studie, bei der die Regeneration bei Mäusen untersucht wurde, die an einer Störung des Gens RLBP1, das cRALBP codiert, litten. Diese Tiere zeigten eine deutlich verspätete Regeneration von 11-cis-Retinal (Saari et al. 2001).

*In-vivo* und *in-vitro* Studien zeigen, dass cRALBP sehr wahrscheinlich als wichtigster Bestandteil im visual cycle die Oxidation von 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal durch die 11-cis-Retinol-Dehydrogenase erleichtert (Golovleva et al. 2003; Saari et al. 1994; Saari et al. 2001; Stecher et al. 1999; Winston & Rando 1998).

cRALBP existiert auch im Ziliarkörper, der Kornea, der Pinealdrüse, dem N. opticus und der Iris. Auch von Oligodendrozyten des Gehirns wird cRALBP exprimiert, jedoch ohne endogene Liganden, die Retinoid gebunden haben (Saari et al. 1997). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass cRALBP mehrere physiologische Rollen erfüllt (Saari et al. 1997).

## **2.4.2 cRALBP und retinale Dystrophien**

Nachdem die wichtige Funktion von cRALBP als Akzeptor von 11-cis-Retinol während des visual cycles bereits eingehend beschrieben worden ist, liegt die

Vermutung nahe, dass Mutationen in dem Gen RLBP1, das cRALBP codiert, retinale Dystrophien mit sich bringen.

Zu diesen retinalen Dystrophien zählen die Retinitis pigmentosa (Maw et al. 1997), die Retinitis punctata albescens (Katsanis et al. 2001; Morimura et al. 1999), der Fundus albipunctatus (Katsanis et al. 2001; Morimura et al. 1999), die Bothnia Dystrophie (Burstedt et al. 2001; Burstedt et al. 1999; Granse et al. 2001) und die Newfoundland Rod-Cone Dystrophie (Eichers et al. 2002). Für alle fünf Krankheiten gilt, dass die Patienten unter einem Defekt im Pigmentepithel-Photorezeptor-Komplex leiden. Da bei diesen Erkrankungen zumeist die Stäbchen und weniger die Zapfen betroffen sind, schildern die Erkrankten früher oder später eine zunehmende Nachtblindheit. Ursache aller Krankheiten ist die Mutation von RLBP1. Durch die Mutation wird die Aminosäure Arginin durch Glutamin ersetzt. Als Konsequenz tritt eine Veränderung der Proteinstruktur auf, was wiederum zur Folge hat, dass 11-cis-Retinal nicht mehr so gut gebunden werden kann und dadurch die Regeneration erheblich gestört oder ganz unmöglich ist.

Retinitis pigmentosa ist die häufigste hereditäre Netzhauterkrankung. Die Prävalenz liegt bei etwa 1:5000. Symptome entwickeln sich zumeist im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt (Boughman et al. 1980; Maw et al. 1997).

Mit Retinitis pigmentosa ist eine Gruppe von progredienten Erkrankungen gemeint, die mit Defekten im Pigmentepithel-Photorezeptorkomplex einhergehen. Sie kann als isolierte Erkrankung oder im Rahmen einer Systemerkrankung auftreten (Bayes et al. 1996; Boughman et al. 1980). Kennzeichnend für Retinitis pigmentosa können sein: eine wachsgelb-atrophische Papille, enge Gefäße, Pigmentepithelveränderungen („Knochenkörperchen“), intraretinale Pigmentverklumpungen, Makulaveränderungen und Photorezeptorendegeneration. Der Verlauf ist an beiden Augen meist symmetrisch, selten einseitig. Inselförmige Defekte im Gesichtsfeld können sich weiter peripher ausdehnen und in einer konzentrischen Gesichtsfeldeinschränkung münden.

Zunächst zeigt sich im Gesichtsfeld ein Ringskotom, später ein „Flintenrohr-Gesichtsfeld“. Erst spät kommt es zu einem Verlust des zentralen Sehens. Zapfen sind weniger als Stäbchen betroffen. Retinitis pigmentosa geht mit früher symptomatischer Nachtblindheit einher. Die Sehschärfe bleibt zunächst häufig gut

erhalten. Die Netzhautperipherie ist im Krankheitsprozess weniger widerstandsfähig als zentrale Netzhautareale.

Dies führt dazu, dass die Fähigkeit, sich in unübersichtlicher Umgebung zu bewegen, immer stärker eingeschränkt wird. Im Spätstadium müssen sich die Betroffenen mit blindentechnischen Hilfsmitteln orientieren, obwohl ihre Sehschärfe durchaus noch gut sein kann.

Bei der typischen Retinitis pigmentosa (Stäbchen-Zapfen-Dystrophie) kommt es meist ab dem dritten Lebensjahrzehnt zu Beeinträchtigungen in Beruf, Mobilität und Privatleben der Patienten durch das eingeschränkte Sehen. Der individuelle Verlauf ist aber nur schwer vorhersagbar (Bayes et al. 1996; Hecklenlively & Ewan 1988).

Die Retinitis punctata albescens ist eine Form der Retinitis pigmentosa. Sie weist dieselben Symptome und ERG-Veränderungen wie die klassische Retinitis pigmentosa auf, zeigt aber ein anderes ophthalmoskopisches Bild. Am gesamten Fundus finden sich kleine, scharf begrenzte, weißlich gelbe Punkte. Im späteren Verlauf entwickeln sich Knochenkörperchen der Fundusperipherie (Bernal et al. 2001; Katsanis et al. 2001; Morimura et al. 1999).

Der Fundus albipunctatus entspricht der nicht progredienten Form der Retinitis punctata albescens und sieht dieser ophthalmoskopisch sehr ähnlich. Die Erkrankung geht mit angeborener, nicht progredienter Nachtblindheit einher. Gesichtsfelddefekte und Visusminderung treten nicht auf (Katsanis et al. 2001; Morimura et al. 1999; Sato et al. 2004).

Die Bothnia Dystrophie ist eine mildere, atypische Variante der Retinitis punctata albescens mit einer hohen Prävalenz in Nordschweden. (Burstedt et al. 2001; Burstedt et al. 2003; Burstedt et al. 1999; Granse et al. 2001). Studien zeigten eine Mutation in dem cRALBP codierenden Gen RLBP1 (Burstedt et al. 1999). Phänotypisch ist die Bothnia Dystrophie gekennzeichnet durch eine bereits in der Kindheit entstehende Nachtblindheit (Burstedt et al. 2001). Untersuchungen zum Gesichtsfeld der Patienten konnten eine zunehmende Skotombildung zeigen. Während Patienten unter 15 Jahren noch keine Veränderungen aufwiesen, konnten bei Patienten in der sechsten Lebensdekade nur noch kleine, peripher gelegene, aktive Gesichtsfeldinseln nachgewiesen werden. Die Messung der Dunkeladaptation wies altersunabhängig extrem unterdurchschnittliche Werte im Vergleich zu gesunden Menschen auf. So wurden bei den Patienten Zeiten von 5-

12 Stunden bis zur völligen Wiederherstellung des Ausgangwertes gemessen (Burstedt et al. 2003).

Die klinischen Befunde der Newfoundland Rod-Cone Dystrophy zeigen, dass sich dieses Augenleiden bereits in früher Jugend manifestiert und vergleichsweise schnell zu wesentlichem bzw. totalem Visusverlust in der vierten oder fünften Lebensdekade führt (Eichers et al. 2002).

### **2.4.3 cRALBP und ERU**

Eine Arbeit zur Untersuchung der humoralen Immunantwort von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis auf die Erkennung retinaler Autoantigene wurde 2003 angefertigt. Nachdem bereits gezeigt wurde, dass IRBP und S-Antigen an der ERU beteiligt sind (Deeg et al. 2002b), kam man zu dem Schluss, dass sehr wahrscheinlich noch weitere Autoantigene an dem Geschehen teilnehmen. Auch eine andere Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass mindestens ein weiteres Autoantigen beteiligt ist (Maxwell et al. 1991). Nachdem es aufgrund der eindimensionalen Auftrennung der Retinapräparationen nicht gelungen war, diese potenziellen Autoantigene zu identifizieren, wurden zweidimensionale Western Blots dazu benutzt, diese potenziellen Autoantigene zu detektieren und anschließend in der Massenspektrometrie zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden die Pferderetinae von 21 an ERU erkrankten und 22 augengesunden Tieren im ein- und zweidimensionalen Western-Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die ERU-Patienten auf Spots im zweidimensionalen Western-Blot reagierten, die von keinem der Kontrolltiere erkannt wurden. Ein Spot wurde mittels Massenspektrometrie eindeutig als zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (cRALBP) identifiziert (Pompetzki 2003).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Untersuchungsmaterial**

#### **3.1.1 ERU-Patienten**

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Seren von 289 ERU-Patienten und die Glaskörperspülproben von 326 ERU-Patienten aus dem Klientel der Pferdeklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen. Dabei wurden auch 95 Seren und 10 Glaskörperspülproben von augengesunden Pferden entnommen.

Die Glaskörperspülproben wurden während der OP-Methode der Vitrektomie generiert. Dabei wurde der Glaskörper durch die BSS-(balanced salted solution) Lösung um den Faktor 1:200 verdünnt.

Um T-Zellproliferationsassays durchführen zu können, wurden ERU-Patienten und augengesunden Pferden Blut abgenommen und sofort weiterbearbeitet.

Um die Beteiligung von cRALBP am Epitop Spreading zu untersuchen, wurden von 15 Pferden, auf die über einen längeren Zeitraum der Zugriff möglich war, Lymphozyten präpariert und von diesen Tieren Serum gewonnen.

#### **3.1.2 Versuchspferde**

Da zur Charakterisierung eines potenziellen Autoantigens die Immunisierung von Versuchstieren unumgänglich ist, wurden während dieser Dissertation 3 Versuchspferde zugekauft. Die Pferde wurden auf fakultätseigenem Gelände gehalten und von fachkundigem Personal täglich betreut. Die Regierung von Oberbayern genehmigte diese Versuche unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-86/02.

Die Versuchspferde wurden mit Protein, das aus den Aufreinigungen unter denaturierenden bzw. nativen Bedingungen gewonnen wurde, immunisiert. Dabei wurden ein Pferd mit cRALBP, das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurde, immunisiert und zwei Pferde mit cRALBP, das unter nativen Bedingungen aufgereinigt wurde (siehe Punkt 3.3), immunisiert. Die Pferde erhielten dabei dreimal im Abstand von vier Wochen 500 µg Protein, das in 0,5 ml

FCA<sup>1</sup> emulgiert war. Zusätzlich wurde den Tieren 2 ml abgetötete *B. pertussis*<sup>2</sup> (enthielt  $2 \times 10^{10}$  abgetötete Bakterien) i.v. appliziert. Die Tiere wurden an Tag 21 nach der dritten Immunisierung mit Eutha 77<sup>3</sup> (100 ml i.v.) getötet. Im Anschluss daran wurden die Augen entnommen, die dann in Bouin´sche Fixierlösung (siehe Punkt 3.2.6) verbracht wurden.

### 3.1.3 Klinisches Scoring nach Gerhards und Thureau

Um im Vorfeld der Immunisierung von Versuchspferden eine bereits vorausgegangene entzündliche Veränderung des Auges im Sinne einer ERU ausschließen zu können, wurden die Tiere von Tierärzten der Pferdekllinik der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht. Auch die Beurteilung des Auges während des Versuchs wurde von Tierärzten betreut, wobei diesen Untersuchern nicht mitgeteilt wurde, ob und mit welchem zu charakterisierenden potenziellen Autoantigen diese Pferde immunisiert wurden. Der klinische Score wurde anhand des von Gerhards und Thureau entwickelten Schemas beurteilt (Deeg et al. 2004).

Im Anschluss daran wurde den Pferden in regelmäßigen Abständen Blut entnommen. Nach Desinfektion der Injektionsstelle mit 70%igem Ethanol wurde Blut mit sterilen Spritzen aus der Vena jugularis entnommen und steril in die Lithium-Heparin-Blutröhrchen<sup>4</sup> überführt, ohne die Blutzellen dabei zu zerstören. Dann wurde das gefüllte Röhrchen für 15 Minuten aufrecht abgestellt, damit die Erythrozyten absinken konnten. Das so gewonnene Plasma wurde gleich weiterverarbeitet. Das Serum wurde in ähnlicher Weise gewonnen. Die gefüllten Serumröhrchen wurden bei 37° C für zwei bis drei Stunden inkubiert. Das Serum wurde nach zehnminütiger Zentrifugation bei 650 x g abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

---

<sup>1</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>2</sup> Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Karl-Heinz Hungerer, Behringwerke, Marburg

<sup>3</sup> Fa. Essex Pharma GmbH, München

<sup>4</sup> Fa. Sarstedt, Nümbrecht

### 3.1.4 Versuchsratten

Für die Tierversuche zur Uveitogenität von cRALBP wurden Lewisratten<sup>5</sup> verwendet. Die Ratten wurden in Kleingruppen in Macrolonkäfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt.

Die Lewisratten wurden mit einer Emulsion aus 200 µg cRALBP emulgiert in 100µl Freund's komplettem Adjuvans (FCA) subkutan immunisiert. Zusätzlich bekamen die Ratten 0,2 ml abgetötete *B. pertussis* ( $2 \times 10^9$ /Tier) intraperitoneal appliziert. Die Ratten wurden nach der Immunisierung getötet. Die Kontrollratten wurden mit der gleichen Menge immunisiert, wobei cRALBP durch BSA ersetzt wurde. Um Einflüsse aus der nativen Aufreinigung auf die Untersuchungsergebnisse auszuschließen, wurden in einer zusätzlichen Kontrollgruppe Ratten mit IL-12 p40 immunisiert, einem Protein das unter gleichen Bedingungen generiert wurde wie cRALBP.

Zum Versuchsende wurden die Ratten mit Ether narkotisiert und schmerzfrei getötet. Um der schnellen Cruorbildung zu entgehen, wurde den Ratten nach Eintreten des Todes das Herz punktiert, um somit Serum zu gewinnen. Im Anschluss daran wurde die Milz unter sterilen Bedingungen entfernt und anschließend die präparierten Zellen in den Milzzell-Proliferationsassay verbracht. Dann wurden die Augen entnommen und in Bouin'scher Lösung (siehe 3.2.6) fixiert.

## 3.2 Puffer und Lösungen

### 3.2.1 Herstellung von rekombinatem cRALBP

#### LB-Medium:

25 g LB-Pulvermedium<sup>6</sup>  
ad 1000 ml Aqua dest.

#### LB-Amp-Medium:

25 g LB-Pulvermedium  
ad 1000 ml Aqua dest.  
1 ml Ampicillin<sup>7</sup> [100 mg/ml]/liter LB-Medium

---

<sup>5</sup> Elevage Janvier, Route Des Chenes Secs, Le Genest Saint Isle, 53940 France

<sup>6</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

1 Liter Waschpuffer für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen:

6,90 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

17,54 g NaCl

1,36 g Imidazol

mit 5 M NaOH pH auf 8,0 einstellen

1 Liter Elutionspuffer für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen:

6,90 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

17,54 g NaCl

17,00 g Imidazol

mit 5 M NaOH pH auf 8,0 einstellen

1 Liter Puffer B für die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen:

13, 8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

1,2 g Tris<sup>8</sup>

480, 5 g Harnstoff

mit 5 M NaOH pH auf 8,0 einstellen

1 Liter Puffer C für die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen:

13, 8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

1,2 g Tris

480, 5 g Harnstoff

mit 5 M HCl pH auf 6,3 einstellen

1 Liter Puffer E für die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen:

13, 8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

1,2 g Tris

480, 5 g Harnstoff

mit 5 M HCl pH auf 4,5 einstellen

---

<sup>7</sup> Fa. Biochrom, Berlin

<sup>8</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

### 3.2.2 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

#### Beschichtungspuffer pH 9,2

3,11 g Dinatriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )<sup>9</sup>

6,00 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )<sup>10</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2

8,00 g NaCl

0,20 g KCl

1,45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,20 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

ad 1000 ml Aqua dest.

#### PBS-T (0,05% Tween 20)

0,5 ml Tween20<sup>®11</sup>

ad 1000 ml PBS.

#### 1% BSA-PBS-T Lösung

1 g Bovines Serum Albumin Fraktion V<sup>12</sup>

ad 100 ml PBS-T, vor Gebrauch herstellen.

#### TMB-Puffer

8,2 g Na-Azetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )<sup>13</sup>

3,15 g Zitronensäure-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ )

ad 1000 ml Aqua bidest.

#### TMB-Stammlösung

6 mg 3,3';5,5' Tetramethylbenzidin (TMB)<sup>14</sup>

ad 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)<sup>15</sup>.

---

<sup>9</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>10</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>11</sup> Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>12</sup> Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>13</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>14</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>15</sup> Alfa Aesar, Karlsruhe

#### TMB-Gebrauchslösung

332 µl	TMB Stammlösung
10 ml	TMB Puffer, 37°C
3,3 µl	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>16</sup>

in der aufgeführten Reihenfolge mischen und sofort verwenden.

#### 1 M Schwefelsäure

472 ml	Aqua dest.
28 ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96% <sup>17</sup>

### **3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

#### 1,5 M Gelpuffer, pH 8,8

18,15 g Tris  
mit 5 M HCl auf pH 8,8 titrieren

ad 100 ml Aqua bidest.

#### 10% Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)-Lösung

10,0 g Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)<sup>18</sup>

ad 100 ml Aqua bidest.

#### 10% Ammoniumpersulfatlösung

0,10 g Ammoniumpersulfat<sup>19</sup>

ad 1 ml Aqua bidest, bei -20°C lagern

#### 0,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 6,8

6,0 g Tris

mit 5 M HCl auf pH 6,8 titrieren

---

<sup>16</sup> Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>17</sup> Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>18</sup> Fa. AppliChem, Darmstadt

<sup>19</sup> Fa. Biorad, München

ad 100 ml Aqua bidest.

#### Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

15,0 g	Tris
72,0 g	Glycin <sup>20</sup>
5,0 g	SDS

ad 1000 ml Aqua bidest.

Die Stammlösung wurde zur Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

### **3.2.4 Western Blot**

#### 0,3 M Anodenpuffer I, pH 10,4

36,33 g	Tris
200 ml	Methanol, reinst <sup>21</sup>

ad 1000 ml Aqua dest.

#### 25 mM Anodenpuffer II, pH 10,4

3,03 g	Tris
200 ml	Methanol, reinst

ad 1000 ml Aqua dest.

#### Kathodenpuffer, pH 9,4

3,03 g	Tris
5,25 g	6-Aminocaprinsäure <sup>22</sup>
200 ml	Methanol, reinst

ad 1000 ml Aqua dest.

#### PBS–Tween–Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP) pH 7,2

10 g	Polyvinylpyrrolidone (PVP40) <sup>23</sup>
------	--

ad 1000 ml PBS-T

---

<sup>20</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>21</sup> Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

<sup>22</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>23</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### 3.2.5 Coomassiefärbung

#### Coomassie Färbelösung

2,0 g Coomassie Brilliant Blue R 250<sup>24</sup>

500 ml Ethanol

100 ml Essigsäure 100%<sup>25</sup>

ad 1000 ml Aqua bidest.

#### Entfärbelösung

250 ml Ethanol

70 ml Essigsäure 100%

ad 1000 ml Aqua bidest.

### 3.2.6 Histologie

#### Bouin'sche Lösung

15 Teile gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung<sup>26</sup>

5 Teile 35% Formol<sup>27</sup>

1 Teil Eisessig

#### TBS-T

1,21 g Tris

8,76 g NaCl

ad 1l Aqua bidest, einstellen auf pH 7,3

und 0,05% Tween 20

#### 0,1 M EDTA-Puffer pH 8,0

29,22g EDTA<sup>28</sup>

ad 1l Aqua dest.

---

<sup>24</sup> Fa. Serva, Heidelberg

<sup>25</sup> Fa. Applichem, Darmstadt

<sup>26</sup> Fa. Merck, Darmstadt

<sup>27</sup> Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe

<sup>28</sup> Perbio Science, Wien, Österreich

## 3.3 Rekombinante Herstellung von humanem cRALBP

### 3.3.1 Transformation

Träger der DNA, die humanes cRALBP codiert, ist Plasmid Nr. 8<sup>29</sup>. Träger dieser DNA ist der Vektor pET19b<sup>30</sup>. Die das humane cRALBP codierende DNA ist 948 Basenpaare lang. Das N-terminale Ende ist HIS-markiert. Zur rekombinanten Herstellung von humanem cRALBP wurde der E. coli-Stamm BL21StarDE3<sup>31</sup> benutzt. Nachdem die Bakterien aus -80°C langsam auf Eis aufgetaut worden waren, wurden 2 µl des Plasmids mit einer Konzentration von 5 µg/ml auf die Bakterien verbracht. Nach leichtem Anschnappen des Gefäßes mit den Bakterien wurde dieses für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien und das Plasmid für 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad getaucht und dann wieder für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Auf Raumtemperatur gebrachtes S.O.C.-Medium<sup>32</sup> wurde in einem Volumen von 250 µl mit den transformierten Bakterien vermengt und 30 Minuten bei 37°C und 350 rpm in einem Thermomixer<sup>33</sup> geschüttelt. Danach wurde die Bakteriensuspension in 10 ml 37°C warmes LB-Amp-Medium überführt und über Nacht in einem Bakterieneschüttler<sup>34</sup> bei 230 bis 250 rpm geschüttelt. Dabei sollte eine maximale Zeitspanne von 18 Stunden nicht überschritten werden.

### 3.3.2 Induktion

Jeweils 10 ml der Übernachtskultur wurden in 500 ml 37°C warmes LB-Amp-Medium überführt und bei 250 rpm geschüttelt. Dabei wurde von Zeit zu Zeit die OD<sub>600</sub> mittels eines Photometers<sup>35</sup> bestimmt, bis ein Wert von ungefähr 0,6 erreicht wurde. Dann wurde aus der Bakteriensuspension 1 ml entnommen und bei 16000 x g zentrifugiert. Das dabei gewonnene Bakterienpellet diente später als Nullwert bei der Überprüfung der erfolgreichen Induktion mittels SDS-PAGE.

---

<sup>29</sup> Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. John W. Crabb, Ohio, USA

<sup>30</sup> Fa. Novagen, Madison, USA

<sup>31</sup> Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA

<sup>32</sup> Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA

<sup>33</sup> Fa. Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

<sup>34</sup> Fa. Edmund Bühler

<sup>35</sup> Fa. Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Nach Entnahme des Nullwerts wurde die Proteinproduktion mittels IPTG<sup>36</sup> induziert. Im Abstand von je einer Stunde wurden wieder 1 ml Proben entnommen und pelletiert. Nachdem die Bakterienkultur vier Stunden lang bei 250 rpm geschüttelt worden war, wurde sie bei 16000 x g zentrifugiert und somit pelletiert. Vor diesem Schritt wurde das letzte Mal 1 ml als positive Kontrolle für das SDS-PAGE-Gel entnommen. Die gewonnenen Pellets wurden bei -20°C gelagert.

### 3.3.3 Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

Im Vorfeld wurden 40 ml B-PER<sup>37</sup> mit einer Tablette Roche complete EDTA-free<sup>38</sup> vermischt. Dabei genügen 10 ml dieser Lösung zum Resuspendieren eines Bakterienpellets, das aus 250 ml Bakterienkultur gewonnen wurde.

Da während dieser Arbeit meist ein Pellet aus 100 ml Bakterienkultur gewonnen wurde, wurden 4 ml B-PER+complete EDTA-free mit dem Pellet gevortext. Anschließend rotierten die gelösten Pellets 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die gelösten Pellets in 15 ml Falcon-Röhrchen<sup>39</sup> überführt und 10 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand wurde abgenommen und mit 2,5 ml Nickel-NTA-Agarose<sup>40</sup> vermischt. Das Protein und die Nickel-NTA-Agarose rotierten dann für 2 Stunden bei 4°C. Nachdem die Protein-Agarose-Mischung in einer Säule<sup>41</sup> mit dem Durchmesser von 1,5 cm und einer Höhe von 10 cm gepackt war, wurde sie zweimal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Dabei wurden vor dem Waschen der Durchfluss und nach jedem Waschschrift die 2 x 10 ml Waschlösungen wieder aufgefangen. Nach dem Waschen wurde mittels 10 Fraktionen à 500 µl das Protein cRALBP von der Säule eluiert. Die Eluate wurden bis zur Analyse im SDS-PAGE-Gel im Kühlschrank aufbewahrt.

---

<sup>36</sup> Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

<sup>37</sup> Fa. Pierce, Rockford, USA

<sup>38</sup> Fa. Roche, Mannheim

<sup>39</sup> Fa. Greiner, Frickenhausen

<sup>40</sup> Fa. Qiagen, Hilden

<sup>41</sup> Fa. Biorad, München

### 3.3.4 Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Bei dieser Methode wurden die Bakterienpellets, die aus 15 ml Kultur gewonnen wurden, mit 500 µl Puffer B resuspendiert und in 2 ml Eppendorfcups<sup>42</sup> überführt. Diese wurden eine halbe bis eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert und lysiert. Anschließend wurden die Cups bei 15000 x g zentrifugiert. Nun wurden Nickel-NTA-spin columns<sup>43</sup> mit 600 µl Puffer B äquilibriert, indem diese Säulen 2 Minuten bei 700 x g zentrifugiert wurde, der Durchfluss wurde verworfen. Nach diesem Schritt wurde das Lysat aus der Bakterienkulturzentrifugation auf die equilibrierte Säule verbracht und bei 700 x g 2 Minuten zentrifugiert. Davor wurden 100 µl Lysat als Positivkontrolle für die SDS-PAGE-Analyse aufbewahrt. Nachdem die Säule mit Protein beladen war, wurde sie dreimal mit je 600 µl Puffer C gewaschen. Dazu wurde 3 x 2 Minuten bei 700 x g zentrifugiert und je Waschschrift wieder 100 µl für das SDS-PAGE-Gel aufbewahrt. Drei Eluate à 600 µl wurden mit Puffer E eluiert. Dazu wurde abermals je 2 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Die Eluate wurden bis zur Analyse im SDS-PAGE-Gel im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.3.5 Dialyse

Nachdem der Erfolg der Proteinaufreinigung mittels SDS-PAGE kontrolliert worden war, wurden ausgewählte Eluate dialysiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass Elutionsvolumina mit annähernd gleich dicken Banden gemeinsam dialysiert wurden, um keine Konzentrationseinbußen durch Elutionsvolumina mit vergleichsweise niedrigerer Proteinkonzentration einzugehen.

Ein Dialyseschlauch<sup>44</sup> mit einem cut off von 14 kDa wurde in Aqua dest. eingeweicht und die Eluate mittels einer Pasteurpipette in den Schlauch verbracht. Die Eluate wurden gegen das 2000-fache Volumen des zu dialysierenden Proteinvolumens in PBS pH 7,2 24 Stunden bei 4°C dialysiert. Während dieser 24 Stunden wurde das PBS mit einem Magnetrührer in

---

<sup>42</sup> Fa. Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

<sup>43</sup> Fa. Qiagen, Hilden

<sup>44</sup> Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Bewegung gehalten. Nach der Dialyse wurden die Eluate mittels Kanüle und 2 ml Spritze in Cups überführt.

### 3.3.6 Entfernung von Lipopolysaccharid (LPS)

Die Entfernung von LPS aus den Eluaten wurde mit EndoTrap<sup>45</sup> durchgeführt. Dazu wurde die fabrikfertig gepackte Säule von ihrer Storage Solution<sup>46</sup> befreit, indem der Großteil der Flüssigkeit abpipettiert wurde und der verbleibende Rest durch die Säule lief. Dann wurde die Säule 6 x mit 6 ml Regeneration Buffer<sup>47</sup> gewaschen, anschließend mit 6 x 6ml Equilibration Buffer äquilibriert. Im weiteren Verlauf wurden die Proteinproben, deren Konzentrationen von Aufreinigung zu Aufreinigung variierten, auf die Säule pipettiert, der Durchfluss wurde vollständig aufgefangen. Das Protein wurde dann wieder mit 6 x 6 ml Equilibration Buffer in Fraktionen à 1 ml eluiert.

Anschließend wurde die Säule mit 20% Ethanol befüllt und bei 4°C gelagert.

### 3.3.7 NO-Assay

Die LPS-Entfernung wurde auf einer LPS sensitiven Hühnermakrophagenzelllinie (HD11) überprüft. Dazu wurden HD11-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/Delle) für 48 h bei 40°C und 5 % CO<sub>2</sub> mit den zu testenden Proben inkubiert. Stickstoffmonoxid wird in wässrigen Lösungen zu den stabileren Produkten NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in einem Verhältnis von 2:3 umgewandelt. Die Nitritkonzentration in Zellkulturüberständen kann mit Hilfe der Griess-Reaktion photometrisch bestimmt werden. Hierzu wurden 50 µl der Zellkulturüberstände in die Kavitäten einer 96-Lochplatte pipettiert und mit 50 µl Griess-Reagenz<sup>48</sup> versetzt. Die Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm quantifiziert. Aus den Extinktionswerten einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe der Natriumnitrit-Stammlösung wurde eine Regressionsgerade erstellt und anhand dieser die Nitritkonzentration der Proben ermittelt. LPS, in einer Startmenge von 2 µg, wurde in einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe austitriert. Als

---

<sup>45</sup> Fa. Profos AG, Regensburg

<sup>46</sup> Fa. Profos AG, Regensburg

<sup>47</sup> Fa. Profos AG, Regensburg

<sup>48</sup> 1 g Sulfanilamid in 100 ml 2,5% Phosphorsäure (Lösung A) + 0,3 g Naphtylethylendiamin in 100 ml 2,5% Phosphorsäure (Lösung B); kurz vor Gebrauch mischen

zusätzliche Positivkontrolle wurde chicken IFN- $\gamma$ , das in HD11-Zellen eine Nitritproduktion stimuliert, ebenfalls in einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe austitriert.

### 3.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der LPS-freien cRALBP-Fractionen wurde mit einem BCA-ASSAY-Kit<sup>49</sup> durchgeführt. Die Grundlage dieses Assays ist die Biuret-Reaktion, bei der die Peptidverbindungen beim Zusatz von Kupferionen im alkalischen Milieu einen rosaroten bis tiefviolettblauen Farbkomplex bilden. Dieser wird photometrisch gegen eine Standardkurve gemessen und dadurch berechnet. Die Standards bestehen aus Albuminverdünnungen in den Konzentrationen von 2000 bis 25  $\mu\text{g/ml}$ . Nach Auftauen der Standards wurde das Working reagent (WR) aus 50 Teilen Reagent A<sup>50</sup> und einem Teil Reagent B<sup>51</sup> hergestellt.

Die BCA-Standards wurden, wie die zu bestimmenden Proteinlösungen, in einem Doppelansatz mit je 25  $\mu\text{l}$  auf eine 96-Lochplatte mit Flachboden pipettiert. Zu diesen Ansätzen wurden je 200  $\mu\text{l}$  WR hinzugegeben. Anschließend wurde die Platte 30 Sekunden auf einem Plattenschüttler geschüttelt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach kühlte die Platte auf Raumtemperatur ab und wurde bei 562 nm im Plattenphotometer<sup>52</sup> gemessen. Dann wurde aus den Doppelansätzen jeweils ein Mittelwert bestimmt, der als weitere Rechengrundlage diente. Aus den Standardwerten wurde eine Kurve erstellt, mit deren Hilfe die Konzentrationen der Proben bestimmt wurden.

## 3.4 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

### 3.4.1 Beschichten der ELISA-Platte

Dieses Verfahren wurde dazu verwendet, in einer großangelegten Reihenuntersuchung Autoantikörper gegen cRALBP in Pferdeseren und Glaskörperproben nachzuweisen. Das rekombinante humane cRALBP wurde so in Beschichtungspuffer verdünnt, dass eine Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  erreicht wurde. Davon wurden 100  $\mu\text{l}$  pro Delle auf eine 96-Loch-NUNC-Maxisorp<sup>®53</sup>-

---

<sup>49</sup> Pierce, Rockford, USA

<sup>50</sup> Pierce, Rockford, USA

<sup>51</sup> Pierce, Rockford, USA

<sup>52</sup> Fa. SLT Lab Instruments, Crailsheim

<sup>53</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

Polystyrenplatte aufgetragen. Über Nacht wurde die beschichtete Platte bei 4°C belassen. Das rekombinante cRALBP bindet dabei an die Bindungsstellen der Platte. Nach dem Waschen mit PBS-T in einem Washer<sup>54</sup> wurde mit 1% BSA-Lösung blockiert, damit die verbleibenden freien Bindungsstellen nicht an unspezifische Proteine binden. Dazu wurden 200 µl pro Delle verwendet. Nach mindestens einstündiger Blockierung bei Raumtemperatur wurde die Platten im Washer gewaschen.

### 3.4.2 Durchführung des ELISA

Die Patientenserum und die Glaskörperspülproben wurden 1:1000 in PBS-T vorverdünnt, ebenso die Positiv- und Negativkontrollen. Das Auftragen der Seren und Glaskörperproben erfolgte im Doppelansatz zu je 100 µl pro Delle. Danach wurde die Platte eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einem wiederholten Waschschrift wurde sekundärer, Peroxidase-gekoppelter Antikörper (rabbit-anti-horse-IgG<sup>55</sup>) in einer Verdünnung von 1:20000 mit 50 µl pro Delle aufgetragen. Wiederum nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und nachfolgendem Waschen wurde Tetramethylbenzidin (TMB)-Gebrauchslösung mit 100 µl pro Delle einpipettiert. Die Platte wurde zwei Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert und mit 50 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Delle gestoppt und im Plattenphotometer<sup>56</sup> bei 450 nm gemessen.

Die Errechnung der Positivhürde erfolgte stets nach demselben Schema. Aus den Extinktionen von 10 Kontrollseren mit niedriger Extinktion, die auf jeder Platte mitgeführt wurden, wurde ein Mittelwert gebildet, von dem der Durchschnittswert der Leerwerte<sup>57</sup> abgezogen wurde. Der Leerwert bestand aus PBS-T und sekundärem Antikörper ohne den Zusatz von Serum. Zu diesem Ergebnis wurde die 5-fache Standardabweichung der Kontrollseren hinzu addiert. Das Ergebnis diente als Grenzwert zwischen positiven und negativen Proben.

---

<sup>54</sup> Fa. SLT Lab Instruments, Crailsheim

<sup>55</sup> Fa. Sigma-Aldrich, München

<sup>56</sup> Fa. SLT Lab instruments, Crailsheim

<sup>57</sup> Leerwert = PBS-T + sek. Antikörper + TMB-Gebrauchslösung + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.4.3 Statistische Auswertung der Autoantikörperprävalenz

Die Unterschiede in der Frequenz der Autoantikörper zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden wurden mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch überprüft. Dazu wurde das frei im Internet erhältliche Programm „Web Chi Square Calculator“ ([http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web\\_chi.html](http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html)) verwendet.

## 3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode wurde sowohl in der Herstellung von cRALBP zur Überwachung der Induktion und der beiden Aufreinigungen dazu verwendet, die Größe des Proteins zu überprüfen.

Bei diesem Verfahren werden Proteingemische anhand ihrer Masse aufgetrennt.

### 3.5.1 Herstellen der SDS-Polyacrylamidgele

Die Gele mit einer Schichtdicke von 0,5 mm und einer Größe von 5 x 9 cm wurden in einer Biorad Mini Protean II Gießkammer<sup>58</sup> hergestellt. Für das Analysegel mit einer Trennstrecke von 6,5 cm wurde eine 10%ige Acrylamidlösung verwendet, für das Sammelgel eine 4%ige.

	<i>10%ige Lösung</i>	<i>4%ige Lösung</i>
<i>Aqua bidest.</i>	<i>4,20 ml</i>	<i>6,17 ml</i>
<i>Gelpuffer pH 8,8</i>	<i>2,50 ml</i>	
<i>Sammelpuffer pH 6,8</i>		<i>2,50 ml</i>
<i>Acrylamidlösung</i>	<i>3,30 ml</i>	<i>1,33 ml</i>
<i>SDS-Stock 10 %ig</i>	<i>100 µl</i>	<i>100 µl</i>

Unmittelbar vor dem Gießen wurden jeweils 50 µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung<sup>59</sup> und 20 µl TEMED<sup>60</sup> einpipettiert. Für das Analysegel wurden 3,5 ml der 10%igen Lösung in die Kammer gegossen und mit Isopropanol

---

<sup>58</sup> Fa. Biorad, München

<sup>59</sup> Fa. Biorad, München

<sup>60</sup> Fa. Biorad, München

überschichtet. Nach einer Polymerisierungszeit von 40 Minuten wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Analysegel geschichtet. In das Sammelgel wurde der Probenkamm eingelassen, der nach weiteren 40 Minuten entfernt werden konnte.

### **3.5.2 Durchführung der Elektrophorese**

Nach dem Einspannen in die Laufkammer<sup>61</sup> wurden die Gele mit Laufpuffer überschichtet. Die zu analysierende Probe wurde mit dem Laemmli Probenpuffer<sup>62</sup> gemischt und in die Probentasche einpipettiert. Eine Tasche wurde, um die Größe der Banden ermitteln zu können, mit einem Molekulargewichtsmarker<sup>63</sup> beschickt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt und beendet, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers den unteren Gelrand erreichte. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mittels einer Coomassiefärbung angefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

### **3.5.3 Coomassiefärbung**

Die Gele wurden vorsichtig aus der Kammer entfernt und für 30 Minuten in der Coomassiefärbelösung belassen und geschüttelt. Im Anschluss daran verblieben sie für mindestens 4 Stunden in der Entfärbelösung und wurden ebenfalls geschüttelt. Dabei wurde die Entfärbelösung dreimal gewechselt. Danach konnten sie unter Durchlicht betrachtet werden um die Größe des Proteins zu überprüfen.

### **3.5.4 Western Blot**

Um die Bindungseigenschaften zwischen Proteinbanden aus dem SDS-PAGE-Gel und den Serumantikörpern untersuchen zu können, ist es notwendig, die Proteine aus dem Gel auf eine andere Matrix wie Nitrozellulose zu transferieren (Towbin et al. 1979).

---

<sup>61</sup> Mini Protean II, Fa. Biorad, München

<sup>62</sup> Fa. Biorad, München

<sup>63</sup> Fa. Gibco BRL, Carlsbad, Kanada

Der elektrophoretische Transfer der Proteinbanden aus den Mini-Gelen auf die Nitrozellulose erfolgte nach folgendem Verfahren im Semi-Dry-Elektroblotter. Das Blotsandwich zwischen den Plattenelektroden wurde wie nachfolgend beschrieben aufgebaut:

- Auf der mit Aqua bidest. gespülten Plattenanode 4 Lagen in Anodenpuffer I getränktes Fliterpapier<sup>64</sup>
- 2 Lagen in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier
- Die in Aqua bidest. getauchte Nitrozellulosemembran<sup>65</sup>
- Das zu blottende SDS-Gel
- 4 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier

Während des Aufbaus wurden Einmalhandschuhe getragen, Filterpapier und Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten, Luftblasen im Aufbau wurden durch vorsichtiges Rollen eines Glasstabes entfernt. Anschließend wurde die mit destilliertem Wasser gespülte Plattenkathode aufgesetzt. Die Transferzeit betrug bei einer angelegten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Nitrocellulose (56 mA/Gel) 1,5 Stunden.

### 3.5.5 Immunoblot

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem rekombinant hergestellten Protein wirklich um cRALBP handelt, wurden die Proteine der Schweineretina in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und diese Membran mit Serum des immunisierten Pferdes inkubiert. Dabei wurden die Retinaproteine in vorbehandelnden Schritten solubilisiert, denaturiert, reduziert und mittels immobilisierten pH-Gradienten (pH 3-10) zunächst nach der Ladung aufgetrennt (1. Dimension) und anschließend nach der Größe aufgetrennt (2. Dimension). Die hochauflösend getrennte Fraktion wurde auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Nach Bindung des Antikörpers wurde das detektierte Protein mit sekundären Rabbit-anti-horse-IgG-POD-Antikörper<sup>66</sup> auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Ein parallel mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrenntes Gel

---

<sup>64</sup> Whatman Nr. 3, Fa. Whatman, Maidstone, England

<sup>65</sup> Nitrozellulose BA 83, Porengröße 0,2 µm, Fa. Schleicher und Schüll, Dasseln

<sup>66</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

wurde mit Coomassie gefärbt und der auf der Membran detektierte Punkt aus diesem gefärbten Gel geschnitten. Dieser ausgeschnittene Punkt wurde dann in der GSF Neuherberg der MALDI-TOF-Analyse zugeführt.

Um zu überprüfen, ob die ELISA-positiven Seren tatsächlich cRALBP detektiert haben, wurden die positiven Seren nochmals im Immunoblot verifiziert. Dazu wurde cRALBP wie unter 3.5.2 und 3.5.4 beschrieben verarbeitet. Nachdem die Membran mit einer PBS-Tween-Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-PVP) Lösung für mindestens 2 Stunden blockiert wurde, wurde sie mit 1:500 in PBS-T verdünntem Patientenserum für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dabei geschwenkt. Die Membran wurde anschließend dreimal für je 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde ein zweiter Peroxidase (POD)-konjugierter Antikörper verwendet. Die Membran wurde für eine Stunde mit dem 1:10000 in PBS-T verdünnten Rabbit-anti-horse-IgG-POD-Antikörper<sup>67</sup> inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran 6-mal für je 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. Mittels der Enhanced-chemiluminescens (ECL)-Lösung<sup>68</sup>, die nach Angabe des Herstellers angesetzt und auf die Membran aufgetragen wurde, wurde das Signal sichtbar gemacht. Die Detektion der Lumineszens erfolgte mit einem Röntgenfilm<sup>69</sup> bei einer Belichtungszeit von 1,5 Minuten. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einem vollautomatischen Entwickler. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

### 3.6 T-Zellproliferationsassay

Da die ERU durch T-Zellen mediiert wird (Deeg et al. 2002a; Gilger et al. 1999), wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die T-Zellantwort auf diverse retinale Autoantigene und das zu charakterisierende potenzielle Autoantigen cRALBP untersucht.

---

<sup>67</sup> Fa. Sigma, Deisenhofen

<sup>68</sup> Fa. Pierce, Rockford, USA

<sup>69</sup> HR-E30 (100 NIF), Fa. Fuji, Tokio, Japan

## 3.6.1 Präparation der T-Zellen

### 3.6.1.1 Pferd

Das Plasma wurde wie unter 3.1.3 beschrieben gewonnen und sofort weiterverarbeitet. Dazu wurden die gefüllten Heparinröhrchen<sup>70</sup> für 15 Minuten senkrecht aufgestellt, um das Absetzen der Erythrozyten zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurde das lymphozytenreiche Plasma vorsichtig auf die gleiche Menge Ficoll<sup>71</sup> geschichtet. Bei 400 x g wurden die beschichteten Ficollröhrchen 25 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei bildete sich ein rauchig getrübler Ring (Interphase), der die T-Zellen enthält. Diese wurden nun vorsichtig mittels einer Pipette vom Ficoll abpipettiert, wobei die Ficollschicht möglichst unberührt bleiben sollte. Die so gewonnene Lymphozytenpopulation wurden nun in 4°C kaltem PBS pH 7,2 3mal für je 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde dekantiert und das gewonnene Pellet mit frischem PBS pH 7,2 resuspendiert. Nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellsuspension in RPMI 1640<sup>72</sup> + 10% inaktiviertem FCS<sup>73</sup> + 1% Pen/Strep<sup>74</sup> auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 3.6.1.2 Ratte

Nachdem den Ratten unter sterilen Bedingungen die Milzen entfernt worden waren, wurden diese in 4°C kaltes PBS pH 7,2 verbracht. Unter einer sterilen Arbeitsbank wurden die Milzen mit Hilfe eines sterilen Pistills in einer Zellkulturplastikschale auf einem sterilen Zelltrennsieb<sup>75</sup> zerrieben. Im Anschluss daran wurde die Milzsuspension auf das gleiche Volumen Ficoll geschichtet und bei Raumtemperatur bei 400 x g 25 Minuten zentrifugiert. Die dabei gebildete Interphase mit den Milzzellen wurde mit einer Pipette vom Ficoll abpipettiert und dreimal mit kaltem PBS pH 7,2 gewaschen. Dazu wurde die milzzellhaltige PBS-Lösung bei 400 x g 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der

---

<sup>70</sup> Fa. Sarstedt, Nümbrecht

<sup>71</sup> Biochrom AG, Berlin

<sup>72</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>73</sup> Fa. Life Technologies, Karlsruhe

<sup>74</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>75</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Überstand dekantiert und das gewonnene Pellet mit frischem PBS pH 7,2 resuspendiert. Nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellsuspension in RPMI 1640<sup>76</sup> + 10% inaktiviertes FCS<sup>77</sup> + 1% Pen/Strep<sup>78</sup> auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt.

Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 3.6.2 Durchführung

Für die Durchführung dieses Assays wurden unterschiedliche Peptide verwendet. Dies waren bovines S-Ag<sup>79</sup>, PDS-Ag<sup>80</sup> (Peptid des bovinen S-Antigen, aa 342-355 (Wildner & Thureau 1994)), Peptid M<sup>81</sup> (Peptid des bovinen S-Ag, aa 303-320 (Donoso et al. 1986)), S-Ag 286<sup>82</sup> (Peptid des bovinen S-Ag, aa 286-297 (Gregerson et al. 1989)), S-Ag 281<sup>83</sup> (Peptid des bovinen S-Ag, aa 281-296 (Deeg et al. 2002a)). Zusätzlich wurden Die IRBP Peptide PD-IRBP<sup>84</sup> (Peptid des bovinen IRBP; aa 1174-1187 (Wildner & Thureau 1997)), R14<sup>85</sup> (Peptid des bovinen IRBP; aa 1169-1191 (Sanui et al. 1988)), PI731<sup>86</sup> (Peptid des humanen IRBP, aa 731-745 (Deeg et al. 2002a)), PI1137<sup>87</sup> (Peptid des humanen IRBP, aa 1137-1153, (Deeg et al. 2002a)) verwendet. Als Positivkontrolle diente purified protein derivative of tuberculin (PPD)<sup>88</sup> und BSA als Negativkontrolle. Für die Analyse der Immunreaktion auf cRALBP wurde LPS-freies cRALBP verwendet. Sterile 96-Loch-Flachbodenplatten<sup>89</sup> wurden nach folgendem Schema pipettiert:

- 5 µl Peptid [1mg/ml]
- 100 µl Zellsuspension
- 100 µl RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep

---

<sup>76</sup> Fa. Invitrogen, Karlsruhe

<sup>77</sup> Fa. Life Technologies, Karlsruhe

<sup>78</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>79</sup> S-Antigen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Wildner, Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München zur Verfügung gestellt

<sup>80</sup> Biotrend, Köln

<sup>81</sup> Biotrend, Köln

<sup>82</sup> Biotrend, Köln

<sup>83</sup> Biotrend, Köln

<sup>84</sup> Biotrend, Köln

<sup>85</sup> Biotrend, Köln

<sup>86</sup> Biotrend, Köln

<sup>87</sup> Biotrend, Köln

<sup>88</sup> Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>89</sup> Fa. Nunc, Wiesbaden

Nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% im Brutschrank (CO<sub>2</sub>Auto-Zero, Heraeus Instruments, München) wurden die Zellen mit [methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin<sup>90</sup> markiert (3,7 mBq / Kavität). Die Zellen inkubierten nochmals 16h im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit dem Harvester (Filtermate Harvester, Fa. Packard, Dreieich)<sup>91</sup> geerntet. Dabei wurden die Zellen aus den Kavitäten gespült, lysiert und die freigesetzte DNA an einem Glasfaserfilter aufgefangen. Diese Filter wurden 30 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet, danach in Omni Filterkassetten<sup>92</sup> eingelegt und Szintillationsflüssigkeit (20µl / Kavität)<sup>93</sup> aufpipettiert. Die [<sup>3</sup>H]-Aktivität wurde im Beta-Counter (TopCount NXT Microplate, Packard Dreieich)<sup>94</sup> gemessen. Der Einbau des radioaktiven [methyl-<sup>3</sup>H]Thymidin in die DNA gibt Aufschluss über die proliferative Aktivität der Zellen. Der Stimulationsindex wurde errechnet, indem die [<sup>3</sup>H]-Radioaktivität der Probe (Zellen plus Antigen) durch die Kontrolle (Zellen ohne Antigen) geteilt wurde.

### 3.7 Histologie

Nachdem die Augen entnommen worden waren, wurden die Pferdeaugen eröffnet und nach der von Ehrenhofer beschriebenen Schnittführung präpariert (Ehrenhofer et al. 2002). Die Augen der Versuchsratten wurden in toto fixiert. Als Fixierlösung diente die Bouin'sche Lösung, in der die Präparate für 24 Stunden verblieben. Die Augen wurden dann nach folgendem Schema entwässert:

- 70% Ethanol für 24h, dabei wurde das Ethanolbad einmal gewechselt. Während dieser Inkubationszeit wurden die Augen der Versuchsratten halbiert (Schnittführung durch Pupille und Nervus opticus).
- 96% Ethanol 24h, Bad einmal gewechselt
- Isopropanol<sup>95</sup> 24h, Bad einmal gewechselt
- Xylo<sup>96</sup> 24h, Bad einmal gewechselt

---

<sup>90</sup> Fa. Amersham, Freiburg

<sup>91</sup> Fa. Packard, Dreieich

<sup>92</sup> Fa. Packard, Dreieich

<sup>93</sup> Fa. Perbio Science, Bonn

<sup>94</sup> Fa. Packard, Dreieich

<sup>95</sup> Fa. VWR, Darmstadt

Die entwässerten Präparate wurden nach folgendem Schema paraffiniert:

- 1er Paraffin<sup>97</sup> für 24 Stunden
- 3er Paraffin für 24 Stunden
- 6er Paraffin für 24 Stunden
- 9er Paraffin für 24 Stunden

Die paraffinierten Präparate wurden in einer Ausgießstation (AP280-2, Fa. Microm, Walldorf) in Ausgussrähmchen<sup>98</sup> in 9er Paraffin eingebettet. Nach einer Aushärtungszeit auf einer Kryoplatte (-8°C) von mindestens 2 Stunden konnten die so entstandenen Blöcke am Mikrotom geschnitten werden (Mikrotom HM360, Fa. Microm, Walldorf). Die 5 µm dicken Schnitte wurden im Wasserbad auf Objektträger<sup>99</sup> gezogen und auf einer Wärmeplatte (47°C) getrocknet. Vor dem Färben sollten die Schnitte mindestens 24 Stunden bei 39°C im Trockenschrank trocknen, damit während des Färbeprozesses ein Abschwimmen der Schnitte verhindert wird.

### 3.7.1 Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung

Nach ausreichender Trocknungszeit wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, gefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Färbeprotokoll für die HE-Färbung:

Entparaffinieren:

- Xylol 2 x 5 min
- Isopropanol 2 x 5 min
- 96%iges Ethanol 5 min
- 70%iges Ethanol 5 min
- Aqua dest. 5 min

---

<sup>96</sup> Fa. VWR, Darmstadt

<sup>97</sup> ganze Paraffinreihe von Fa. Richard-Allen Scientific zu beziehen über Fa. Microm, Walldorf

<sup>98</sup> Fa. Shandon, Frankfurt

<sup>99</sup> Super Frost Plus, Fa. Menzel, Braunschweig

#### Färben:

- Hämalan<sup>100</sup> 10 min
- Mit Aqua dest. abspülen
- Unter fließendem Leitungswasser 15 min
- Eosin<sup>101</sup> 3 min

#### Entwässern:

- Aqua dest. 5 min
- 70%iges Ethanol 5 min
- 96%iges Ethanol 5 min
- Isopropanol 2 x 5 min
- Xylol 2 x 5 min

Die Schnitte wurden anschließend mit Eukitt<sup>102</sup> permanent eingedeckelt.

### **3.7.2 CD3-Färbung**

Die Schnitte wurden entparaffiniert wie in Abschnitt 3.7.1

- Demaskieren in Citrat-Puffer pH 6,6<sup>103</sup> für 30 min im Wasserdampfbad bei 100°C
- Blockieren: TBS-T mit 1% BSA und 25 µl Ziegen Serum / ml TBS-T für 30 min

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Erster AK: monoklonaler anti-CD3-12-Antikörper<sup>104</sup> 1:100 1h bei Raumtemperatur

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Zweiter AK: Ziegen anti-Ratten-IgG Antikörper biotiniert 1:1000 für 1 h

---

<sup>100</sup> Fa. Richard-Allen Scientific zu beziehen über Fa. Microm, Walldorf

<sup>101</sup> Fa. Richard-Allen Scientific zu beziehen über Fa. Microm, Walldorf

<sup>102</sup> Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

<sup>103</sup> Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

<sup>104</sup> Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Kremmer, GSF Großhadern

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Brücke: Streptavidin-POD<sup>105</sup> 30 min bei RT (für DAB-Färbung) / Streptavidin-AP<sup>106</sup> (für Rot-Färbung und für APschwarz-Färbung)

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Immunfärbung: DAB<sup>107</sup> 50 s oder Alkalische Phosphatase Substrat Rot<sup>108</sup> 50 s oder Alkalische Phosphatase Substrat Schwarz<sup>109</sup> 50s (je nach Färbung)
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.7.1

### 3.7.3 Glutamin-Synthetase (GS)-Färbung

Glutamin-Synthetase markiert Astrozyten und ist ein Schlüsselenzym im Recycling von Glutamat (Kentroti et al. 1991).

Färbeprotokoll:

- Demaskieren: 0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0) 15 min kochen
- Blockieren: Protein-Block-Serum-Free 30 min<sup>110</sup>

---

<sup>105</sup> Elite Kit, Fa. Linaris, Wertheim

<sup>106</sup> Standard AP Kit, Fa. Linaris, Wertheim

<sup>107</sup> Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

<sup>108</sup> Fa. Linaris, Wertheim

<sup>109</sup> Fa. Linaris, Wertheim

<sup>110</sup> Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Erster Ak: anti-Maus-GS<sup>111</sup> 1 : 500 in TBS-T mit 1% BSA, 1h bei RT

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Zweiter Ak: Ziege anti-Maus-IgG-AP<sup>112</sup> 1 : 400, 1h RT

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Immunfärbung: Alkalische Phosphatase Substrat Rot 10 min
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.7.1

### **3.7.4 Glutamin Synthetase-fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP)-Färbung**

GFAP kommt, wie auch GS, in Müllerzellen vor. Es ist ein zytoplasmatisches, filamentäres Protein, welches einen Anteil des Zytoskeletts von Müllerzellen bildet (Hauck et al. 2003).

Färbeprotokoll:

- Demaskieren: 0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0) 15 min kochen
- Blockieren: Protein-Block-Serum-Free 30 min<sup>113</sup>

---

<sup>111</sup> Klon 6, Fa. BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien

<sup>112</sup> Fa. Dianova, Hamburg

<sup>113</sup> Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Erster Ak: anti-Kaninchen-GFAP<sup>114</sup> 1 : 250 in TBS-T mit 1% BSA 1h bei RT

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Zweiter Ak: Ziege anti-Kaninchen-IgG-POD<sup>115</sup> 1 : 200 1h RT

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Immunfärbung: Histogrün<sup>116</sup> 5 min
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

#### Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.7.1

Wurde eine GS/GFAP-Doppelfärbung vorgenommen, so wurden jeweils die beiden ersten und die beiden zweiten AK gemeinsam zugegeben.

### **3.7.5 von-Willebrand-Faktor (vWF)-Färbung**

Das Protein liegt zytoplasmatisch in Endothelzellen vor und vermittelt die Thrombozytenadhäsion nach Zerstörung des Endothels.

Färbeprotokoll:

- Demaskieren: Histo-Enhance-Puffer<sup>117</sup> für 20 min bei 96°C
- Blockieren: TBS-T mit 5% Kaninchenserum

3x mit TBS-T je 5 min waschen

---

<sup>114</sup> Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

<sup>115</sup> Fa. Biorad, München

<sup>116</sup> Fa. Vector, zu beziehen über Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

<sup>117</sup> Fa. Vector, zu beziehen über Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

- Erster Ak: Kaninchen-anti-v.-Willebrand-Faktor (human)<sup>118</sup> 1 : 400

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Zweiter Ak: Ziege-anti-Kaninchen-Biotin<sup>119</sup> 1 : 2000 1h

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Immunfärbung: Streptavidin-POD (Vector Standard AP) 30 min

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Farbstoff VIP (violett)<sup>120</sup> 5min
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.7.1

### 3.7.6 Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)-Färbung

Färbeprotokoll:

- Demaskieren: 0,1 M EDTA-Puffer (pH 8,0) für 15 min kochen
- Blockieren: Protein-Block-Serum-Free 30 min<sup>121</sup>

---

<sup>118</sup> Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

<sup>119</sup> Fa. Vector, zu beziehen über Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

<sup>120</sup> Fa. Vector, zu beziehen über Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

<sup>121</sup> Fa. Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Erster Ak: Maus-anti-human-VEGF<sup>122</sup> 1 : 100

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Zweiter Ak: Ziege-anti-Maus-Biotin<sup>123</sup> 1 : 1000 1h

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Immunfärbung: Streptavidin-AP (Vector Standard AP) 30 min

3x mit TBS-T je 5 min waschen

- Farbstoff AP-Substrat schwarzbraun<sup>124</sup> 5min
- Leitungswasser 5 min (fließend)
- Aqua dest.

Hämalaunfärbung:

- Hämalaun 30 s
- Aqua dest.
- Leitungswasser 15 min (fließend)

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Einbetten wie Abschnitt 3.7.1

### **3.7.7 Beurteilung der pathohistologischen Veränderungen**

Die Schnitte wurden nach dem Schema von Caspi (Caspi et al. 1993) beurteilt.

---

<sup>122</sup> Fa. BD Pharmingen, Erembodegem, Belgien

<sup>123</sup> Fa. Vector, zu beziehen über Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

<sup>124</sup> Fa. Vector, zu beziehen über Fa. Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

Grad	Beschreibung
0	Keine Anzeichen einer Entzündung
0,5	<p>Minimale Entzündungsanzeichen, Architektur der Retina im Schnittbereich weitgehend intakt</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Infiltration von Entzündungszellen in die Retina ohne Gewebeerstörung, eventuell Zerstörung der Photorezeptorenschicht in weniger als ¼ der Retina im Schnittbereich</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Fokale, nicht-granulomatöse Infiltration von Monozyten in die Aderhaut, den Ziliarkörper und die Retina</p>
1	<p>Milde Entzündung und/oder Zerstörung der Photorezeptorenschicht in mindestens ¼ der Retina</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Fokale Bereiche der Zerstörung mit deutlichem Schwund der Photorezeptoren</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Retinale perivaskuläre Infiltration und monozytäre Infiltration in den Glaskörper</p>
2	<p>Milde bis mittelgradige Entzündung und/oder Läsion in mehr als ¼ der im Schnittbereich gelegenen Retina, bis zur äußeren Körnerschicht reichend</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Kleine, exsudative Netzhautablösungen</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Granulombildung in Uvea, Ziliarkörper oder Iris</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Retinale Vaskulitis mit seröser Netzhautablösung und Verlust von Photorezeptoren</p>
3	<p>Mittelgradige Entzündung und/oder Läsionen in mehr als ¼ der im Schnittbereich gelegenen Retina, bis zur inneren Körnerschicht reichend</p> <p><i>und/oder</i></p> <p>Verlust der retinalen Struktur, große exsudative Netzhautablösungen, mäßig bis große Zahl von Zellen im Glaskörper</p>

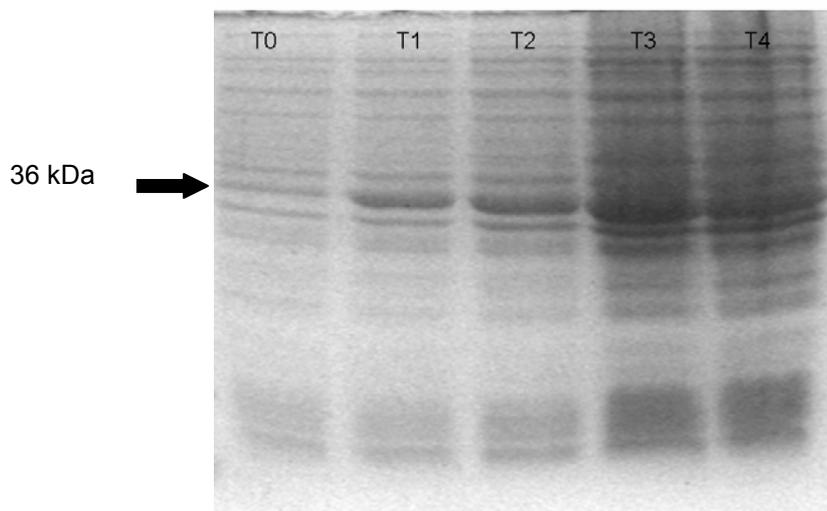
<b>4</b>	Hochgradige Entzündung und/oder Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als $\frac{1}{4}$ der Retina <i>und/oder</i> Völlige Zerstörung der retinalen Architektur
----------	---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Produktion von cRALBP

#### 4.1.1 Induktion mit IPTG

BL21DE3-Stämme von E.-coli wurden mit einem Plasmid transformiert, das humanes, rekombinantes cRALBP trägt. Die erfolgreiche Induktion mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Dabei wurde auf die Zunahme der Bande von cRALBP in Höhe von ca. 36kDa geachtet (siehe Abb. 1). Damit die vorhandenen Bakterienpellets nativ oder denaturierend aufgereinigt werden konnten, musste ein deutlicher Unterschied der Bandendicke zwischen den Zeitpunkten  $T_0$  und  $T_4$  erkennbar sein. War diese Bandendickezunahme nicht erkennbar, hatte die Induktion nicht funktioniert.



*Abb. 1: Diese Abbildung zeigt ein SDS-PAGE-Gel, auf dem alle 5 Zeitpunkte ( $T_0$  –  $T_4$ ) zu sehen sind. Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme der Bande auf der Höhe von ca. 36kDa.*

Abbildung 1 zeigt ein SDS-PAGE-Gel, auf dem die 5 verschiedenen Zeitpunkte der Proteininduktion dargestellt sind ( $T_0$ - $T_4$ ). Zum Zeitpunkt  $T_0$ , das heißt vor der Induktion mit IPTG, ist lediglich eine schwache Bande zu erkennen. Bereits zum Zeitpunkt  $T_1$ , also eine Stunde nach der Induktion, kann eine deutliche Zunahme der Bande erkannt werden. Am deutlichsten war die Zunahme zwischen den Zeitpunkten  $T_2$  und  $T_3$ . Eine erfolgreiche Induktion der Proteinproduktion mit IPTG kann somit nachgewiesen werden. Nach  $T_4$ , also nach 4 Stunden schütteln,

wurde die Proteinproduktion gestoppt und die dabei gewonnenen Bakterienpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

## 4.1.2 Proteinaufreinigung

### 4.1.2.1 Native Aufreinigung

Die native Proteinaufreinigung der bei -20°C gelagerten Bakterienpellets wurde mit Hilfe der SDS-PAGE-Analyse überprüft, das heißt es wurde darauf geachtet, dass Banden auf der Höhe zwischen 35 und 40 kDa nachweisbar waren. Es wurden 10 Fraktionen à 500µl gewonnen. Nach Auswertung des Gels erfolgte die Auswahl der Fraktionen, die zur Dialyse und anschließenden LPS-Entfernung bestimmt waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass Fraktionen mit annähernd gleich dicken Banden gemeinsam dialysiert wurden, um keine Konzentrationseinbußen durch Fraktionen mit vergleichsweise niedrigerer Proteinkonzentration einzugehen.

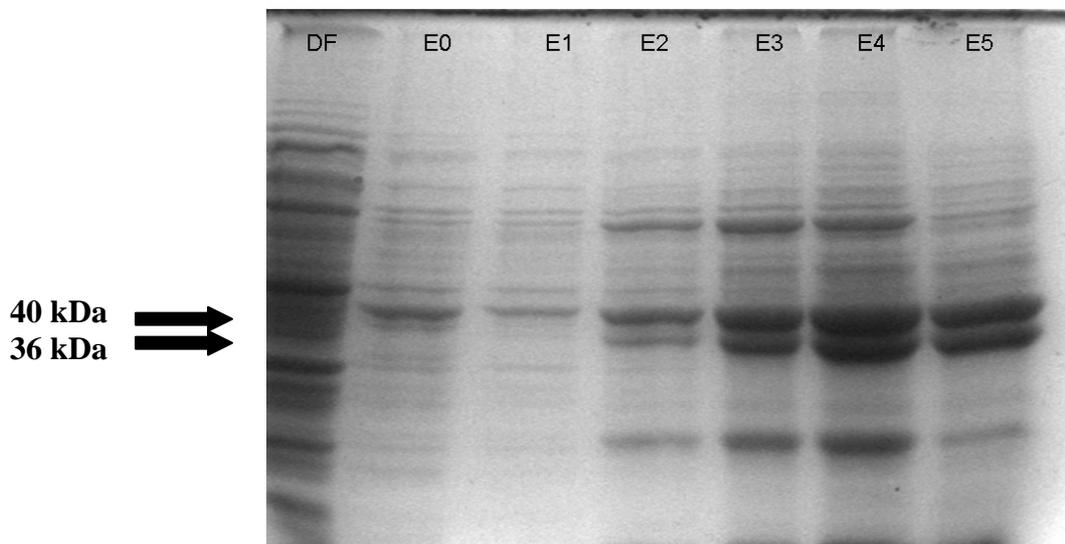


Abb. 2

Die Abbildung zeigt ein SDS-PAGE-Gel, auf dem nach Coomassie-Färbung der Erfolg der nativen Proteinaufreinigung zu sehen ist. **DF**= Durchfluss; **E0-E5**= Elutionsfraktionen

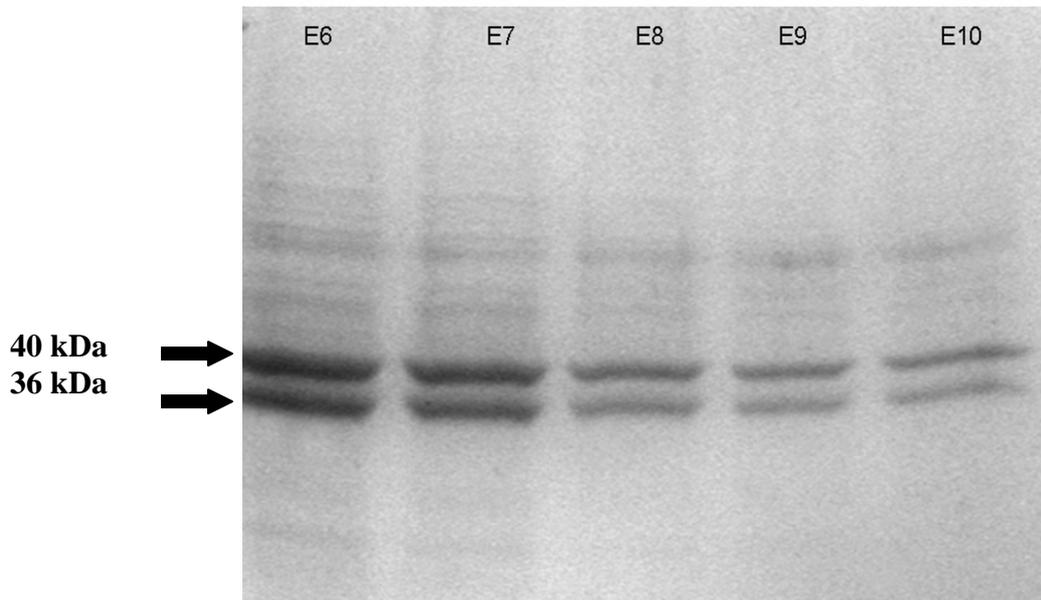


Abb. 3

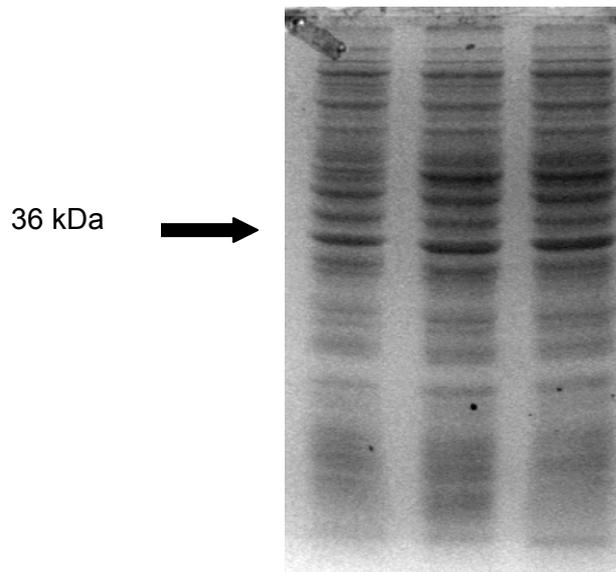
Abbildung 3 zeigt ein SDS-PAGE-Gel, auf dem nach Coomassie-Färbung der Erfolg der nativen Proteinaufreinigung zu sehen ist. **E6-E10**= Elutionsfraktionen

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen SDS-PAGE-Gele, auf denen die Größe des von der Säule eluierten Proteins überprüft wurde. Zu erkennen ist auf Abbildung 2, dass im Durchfluss keine Banden mit der Größe 36-40 kDa zu erkennen sind. Dies zeigt, dass cRALBP erfolgreich an Nickel-NTA binden konnte. Bei den einzelnen Fraktionen (E0-E10) kann eine Zunahme der Bandendicke bis zur 4. Fraktion (E4) beobachtet werden, bei der offensichtlich am meisten Protein enthalten ist. Jedoch zeigen sich auch vermehrt Verunreinigungen im Bereich zwischen 20 und 30 kDa und über 40 kDa. In den Fraktionen E6-E10 ist zwar quantitativ weniger Protein enthalten, jedoch ist dieses nicht so stark verunreinigt wie Protein aus den Fraktionen 1-5. Deswegen wurden weiterhin nur die sauberen Fraktionen 6-10 verwendet, um Einflüsse von anderen Proteinen auf die Immunisierung der Tiere, die ELISAs und die Proliferationsassays von vorneherein minimieren zu können.

#### 4.1.2.2 Denaturierende Aufreinigung

Die denaturierende Proteinaufreinigung wurde ebenfalls mit den bei -20°C gelagerten Bakterienpellets durchgeführt. Die hierbei gewonnenen drei Eluate à

600 µl wurden auch bei diesem Verfahren der SDS-PAGE-Analyse zugeführt, um zu überprüfen, ob sich eine Bande auf der Höhe zwischen 36 und 40 kDa bildet. Hier konnten nur Banden auf der Höhe von 36 kDa gezeigt werden, was mit der denaturierenden Aufreinigung erklärt werden kann. Was auf dem untenstehenden SDS-PAGE-Gel ebenfalls zu erkennen ist (Abb. 4), ist die starke Verunreinigung mit anderen Proteinen.



*Abb. 4: SDS-Gel mit den 3 gewonnenen Fraktionen auf der Höhe von 36 kDa nach Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen*

Im Anschluß daran die sauberste Proteinfraction wieder dialysiert.

#### **4.1.3 Entfernung von LPS aus den Proteinlösungen**

Da Reste von LPS die Ergebnisse der T-Zell-Reaktionen falsch positiv beeinflusst hätten, wurde vor dem Einsatz von cRALBP in den T-Zell-Proliferationsassays LPS entfernt. Um sicher zu gehen, dass sich das Protein auch nach der Säule noch in der Lösung befand, wurde erneut die SDS-PAGE-Analytik angewandt. Die erfolgreiche Entfernung von LPS wurde auf einer LPS sensitiven Hühnermakrophagenzelllinie (HD11) überprüft. Dazu wurde ein LPS-Standard von 2 µg/ml bis zu 500 ng/ml titriert.

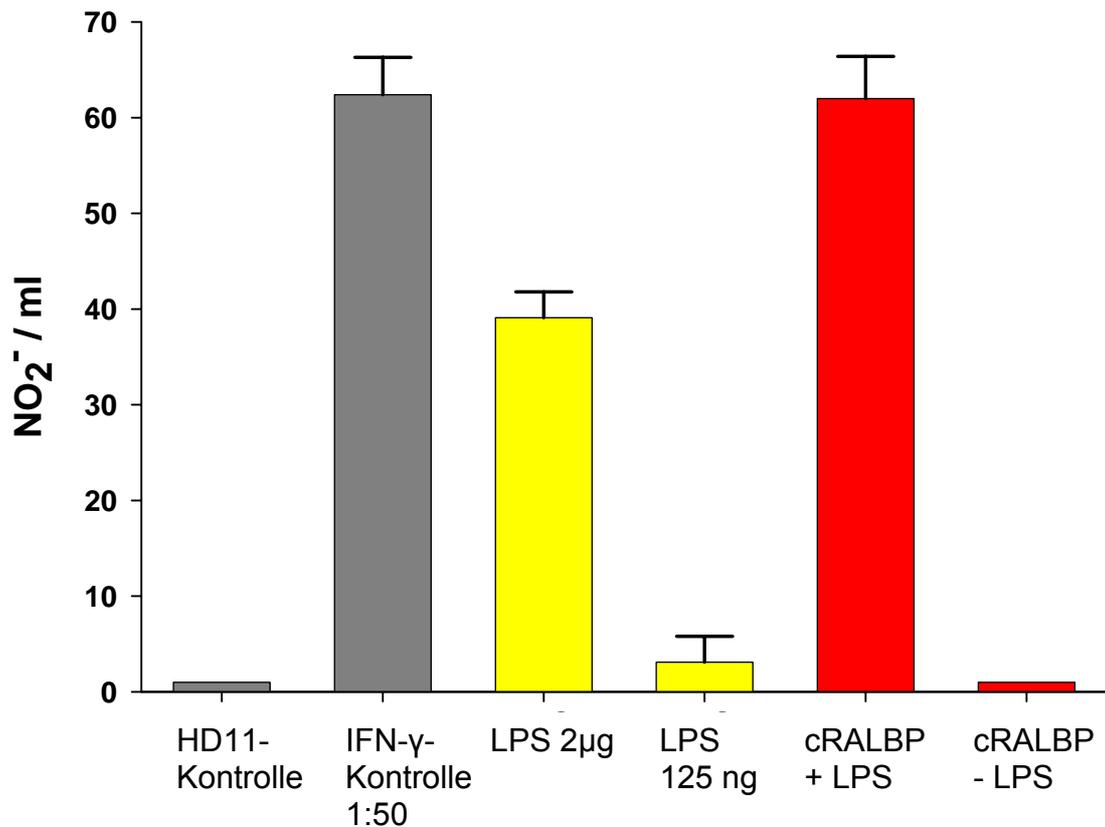


Abb. 5: Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse aus dem HD11-Assay. Deutlich zu erkennen ist, dass cRALBP nach der Entfernung von LPS nur noch mit einem geringen Bruchteil LPS verunreinigt ist.

In Abbildung 5 wird die erfolgreiche LPS-Entfernung aus der cRALBP-Lösung dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied vor und nach der Entfernung von LPS aus der Proteinlösung im Vergleich zu einem titrierten LPS-Standard.

## 4.2 B-Zellantwort von ERU-Patienten auf cRALBP

### 4.2.1 Screening der Seren von ERU-Patienten im indirekten ELISA

Die Seren von 289 an ERU erkrankten Pferden und 95 augengesunden Pferden wurden mittels nicht kompetitivem, indirektem ELISA auf Serumantikörper gegen cRALBP untersucht. Dabei wurden pro 96-Lochplatte stets 10 Kontrollseren verwendet. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung von ungereinigtem cRALBP viele positive Reagenten in beiden Gruppen (ERU-Patienten und Kontrollen) zu

verzeichnen waren. Nach Verwendung von LPS gereinigtem cRALBP zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen in der Frequenz der Autoantikörper positiver Tiere.

	<b>Anzahl ERU-Patienten</b> n=289	<b>Anzahl Kontrollen</b> n=95
<b>Positiv im ELISA (LPS-freies cRALBP)</b>	29,1%	11,6%
<b>MW OD</b>	0,23	0,21
<b>SD</b>	0,03	0,04

*Tabelle 1: Prozentsatz cRALBP positiver ERU-Patienten und Kontrolltiere*

Der ELISA zeigte, dass von den 289 untersuchten ERU-Patienten 29,1% anti-cRALBP-Antikörper aufwiesen, wohingegen nur bei 11,6% der Kontrolltiere anti-cRALBP-Antikörper gezeigt werden konnten. Die Prävalenz der Autoantikörper-Positiven in der ERU-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen zeigt einen hochsignifikanten Unterschied (CHI-Quadrat-Test Autoantikörper-Positiv ERU > Autoantikörper-Positiv Kontrollen;  $p < 0,001$ ).

Zur Sicherheit wurden die ELISA-Ergebnisse durch einen Western-Blot verifiziert, in dem alle positiven Ergebnisse aus dem ELISA bestätigt werden konnten, da sie im Blot ein positives Signal auf der Höhe von 36 kDa zeigten. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei um cRALBP handelt, wurde die Reaktion in 2D-Western-Blots, überprüft. Die detektierten Spots wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert.

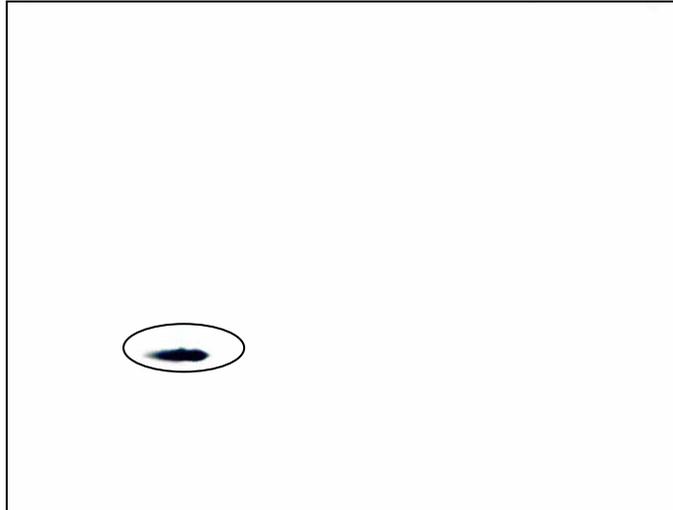


Abb. 6: Diese Abbildung zeigt den Blot einer 2D-Gelelektrophorese, dessen Signal auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde. Die Ellipse kennzeichnet cRALBP

In Abbildung 6 wird der Blot einer 2D-Gelelektrophorese gezeigt. Nachdem die retinalen Proteine einer Schweineretina im 2D-Elektrophoreseverfahren aufgetrennt worden waren, wurde dieses Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Serum eines mit cRALBP immunisierten Pferdes inkubiert, dass im cRALBP Western Blot eine Bande von 36 kDa detektiert. Der sekundäre, POD-konjugierte Antikörper konnte die erfolgreiche Bindung von cRALBP anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar machen. In einem parallel gelaufenen SDS-Gel, das mit Coomassie gefärbt wurde, konnte dieser Punkt ausgeschnitten werden und der MALDI-TOF-Analyse zugeführt werden. Dabei wurde cRALBP mit einem hochsignifikanten Score (73) detektiert (Tabelle 2).

Proteinname	Score	M.W.	p.I.
cRALBP	73	36592 Da	5

Tabelle 2: Detektion von cRALBP als Zielantigen im 2D-Western Blot per MALDI-TOF  
**M.W.**= Molekulargewicht in Da; **p.I.**= isoelektrischer Punkt

#### 4.2.2 Untersuchung von Glaskörperproben im indirekten ELISA

Von Interesse war, ob nur in der Peripherie Autoantikörper gegen cRALBP nachgewiesen werden konnten oder auch im Zielgewebe. Dazu wurden die Glaskörperspülproben von an ERU erkrankten Tieren untersucht.

Die Glaskörperspülproben von 326 an ERU erkrankten Pferden wurden im nicht kompetitiven indirekten ELISA auf Antikörper gegen cRALBP untersucht. Auch hier wurden die positiven Ergebnisse im Immunoblot verifiziert.

Dabei konnte festgestellt werden, dass 19% von an ERU erkrankten Pferden intraokuläre Antikörper gegen cRALBP aufwiesen. Bei keinem Kontrolltier waren anti-cRALBP-Antikörper nachweisbar.

	<b>Anzahl ERU-Patienten</b> n=326	<b>Anzahl Kontrollen</b> n=10
<b>Positiv im ELISA</b>	19,0%	0%
<b>MW OD positive Pferde</b>	0,32	0,07
<b>SD</b>	0,18	0,04

*Tabelle 3: Anzahl cRALBP positiver ERU-Patienten und Kontrolltiere mit Antikörper im Glaskörper*

#### **4.2.3 Epitop Spreading in der B-Zellantwort**

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde zusätzlich die periphere B-Zellreaktion der ERU-Patienten auf die bereits charakterisierten Autoantigene IRBP und S-Ag untersucht, um festzustellen, ob es in der ERU eine spezielle cRALBP-Untergruppe gibt oder ob cRALBP Bestandteil des Epitop Spreading ist. Dabei konnte festgestellt werden (siehe Abb. 7), dass 29,6% der Patienten auf alle drei Autoantigene positiv waren, wohingegen 33,3% der Patienten die Autoantigene IRBP und S-Ag detektierten. Lediglich je 1,9% wiesen Antikörper gegen cRALBP und IRBP bzw. cRALBP und S-Ag auf.

5,5% der untersuchten Pferde hatten nur anti-cRALBP-Antikörper.

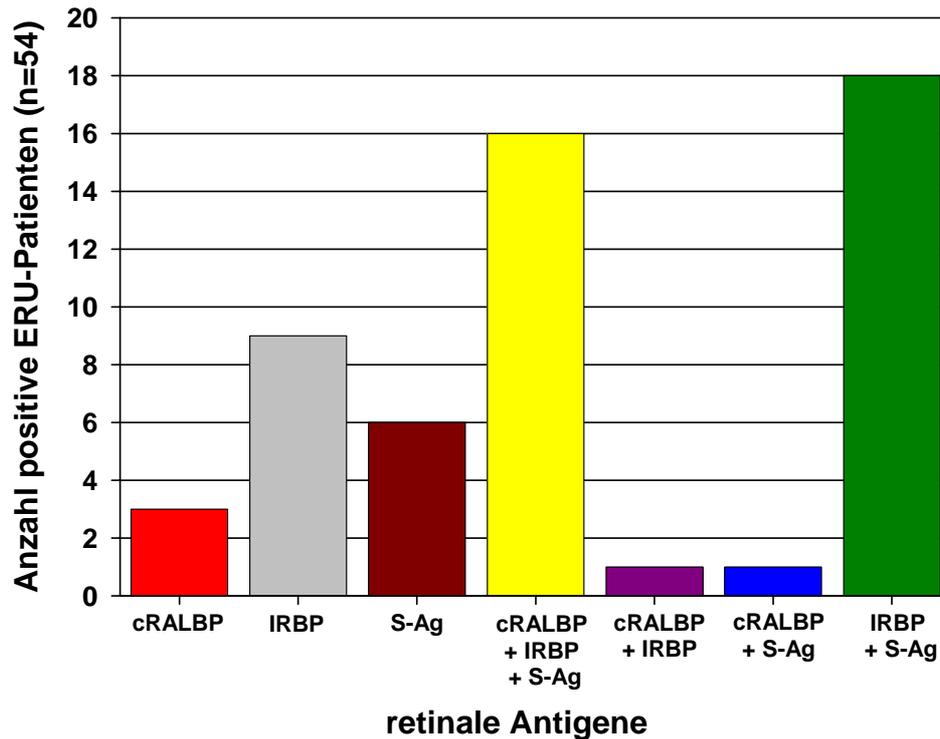


Abb. 7: Nachweis von Antikörper gegen verschiedene retinale Antigene in Serumproben von an ERU erkrankten Pferden.

## 4.3 T-Zellantwort von ERU-Patienten auf cRALBP

### 4.3.1 T-Zell-Proliferationsassays mit cRALBP stimuliert

Um die Reaktion von T-Zellen auf Autoantigene zu bestimmen, wurden T-Zell-Proliferationsassays durchgeführt. Erkennt eine T-Zelle ein spezifisches Antigen, wird sie dadurch stimuliert und beginnt zu proliferieren. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die T-Zellen von 20 ERU-Patienten und 10 Kontrollpferden auf ihre Reaktion gegen cRALBP untersucht. Ein Stimulationsindex (SI) größer oder gleich 2 wurde als positiv bewertet. Da nach der Theorie des Epitop Spreading Patienten, die an einer Autoimmunkrankheit leiden, in ihrem Krankheitsverlauf meist nicht nur auf ein einzelnes, sondern auf mehrere Autoantigene proliferieren, wurden alle Pferde zusätzlich zu cRALBP auf die T-Zell-Antwort auf die Peptide von IRBP und S-Ag untersucht (siehe Abb. 8). Demzufolge waren 6 der ERU-Patienten positiv auf cRALBP, 4 positiv auf S-Ag, 4 positiv auf S-Ag 286, 3 positiv auf PDS-Ag, 2 positiv auf S-Ag 281, 3 positiv auf

R14, 1 positiv auf PI 1137, keiner positiv auf PI 731 und 2 positiv auf PI 536. Von den 10 Kontrollpferden war keines positiv auf die verwendeten Antigene.

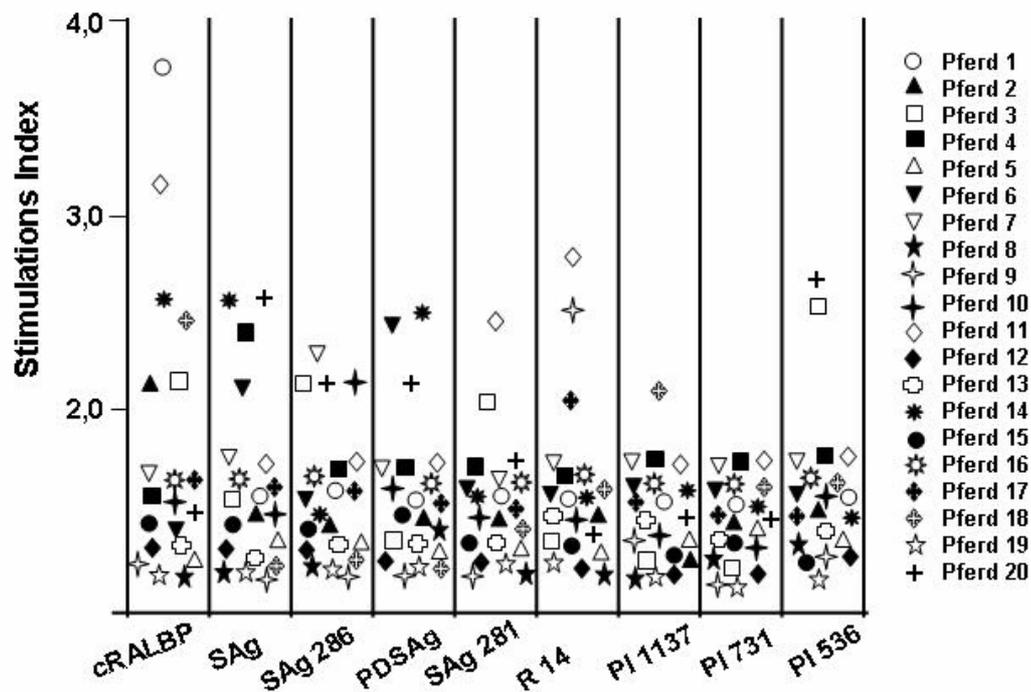


Abb 8: T-Zellproliferation von 20 ERU-Patienten: ein Stimulationsindex größer 2 wurde nach Stimulation mit verschiedenen Autoantigenen als positiv bewertet

#### 4.3.2 Langzeituntersuchung der Reaktionen auf retinale Antigene

Bei zehn ERU-Pferden und 5 Kontrollpferden, auf die über einen längeren Zeitraum der Zugriff möglich war, wurde deren T-Zell-Aktivität wiederholt beobachtet. Dabei sollte untersucht werden, ob diese an ERU erkrankten Pferde ein für das Epitop Spreading typisches Wechseln der Erkennung von Antigenen zeigen.

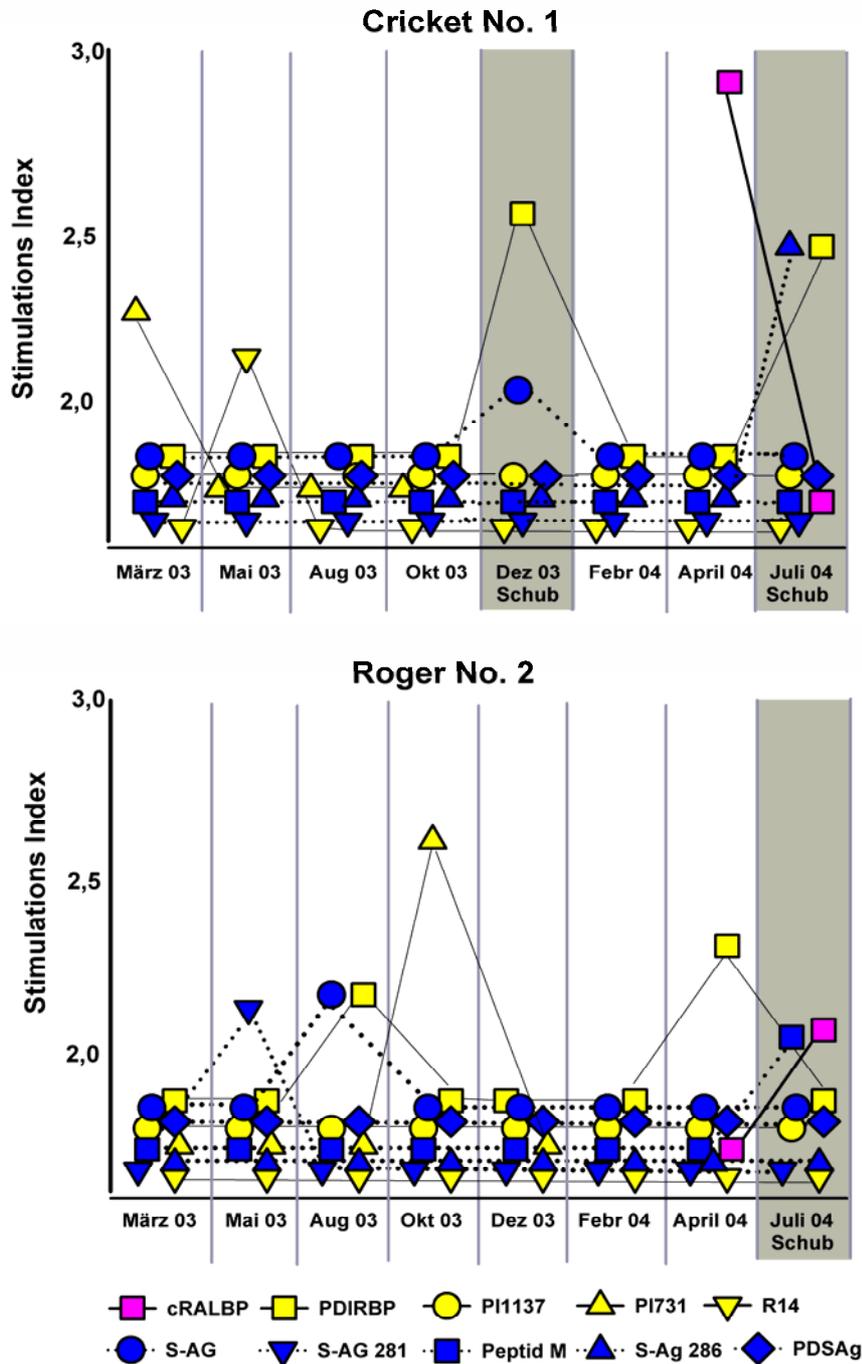


Abb 9: Diese Abbildung zeigt die Proliferation von zwei über einen Zeitraum von 17 Monaten beobachteten ERU-Patienten („Cricket“ und „Roger“) auf die Antigene cRALBP, PDIRBP, PI 1137, PI 731, R14, S-Ag, S-Ag 281, Peptid M, S-Ag 286 und PD-S-Ag; Zeitpunkte, bei denen ein Uveitisschub bei der Blutentnahme vorlag, sind grau unterlegt

Pferd Nummer 1 („Cricket“ siehe Abb. 9) zeigte im März 2003 einen positiven Stimulationsindex auf PI 731 (Peptid von IRBP). Im Mai 2003 konnte eine Reaktion auf das Antigen R14 (Peptid von IRBP) nachgewiesen werden. Während eines akuten ERU-Schubes im Dezember 2003 reagierte der Patient sowohl auf PDIRBP (Peptid von IRBP) wie auch auf S-Ag. Im April 2004 konnte eine positive Reaktion auf cRALBP dargestellt werden. Die letzte gemessene proliferative Aktivität zeigte dieser Patient während eines erneuten ERU-Schubes im Juli 2004 auf die Antigene S-Ag 286 (Peptid von S-Ag) und PDIRBP (Peptid von IRBP).

Im Mai 2003 reagierte Pferd Nummer 2 („Roger“ siehe Abb. 9) auf das Antigen S-Ag 281 (Peptid von S-Ag). Im August 2003 proliferierten die T-Zellen dieses Pferdes sowohl auf S-Ag als auch auf PDIRBP (Peptid von IRBP). Im Oktober 2003 reagierte „Roger“ auf PI 731 (Peptid von IRBP) wohingegen er im April einen positiven SI-Wert auf PDIRBP zeigte (Peptid von IRBP). Während eines Schubes im Juli 2004 konnten bei „Roger“ sowohl Reaktionen auf Peptid M (Peptid von S-Ag) wie auch auf cRALBP gezeigt werden.

cRALBP konnte erst gegen Ende der Versuche mitgetestet werden, als es zur Verfügung stand.

Die anderen acht Pferde zeigten keine proliferative Aktivität auf cRALBP. Zwei der verbleibenden acht ERU-Pferde zeigten intramolekulares Epitop Spreading innerhalb des Proteins S-Ag. Bei den verbleibenden 6 ERU-Pferden konnte ein intermolekulares Epitop Spreading zwischen den Peptiden der Proteine IRBP und S-Ag nachgewiesen werden.

Die 5 Kontrollpferde reagierten auf keines der untersuchten Antigene.

### **4.3.3 T-Zellproliferationsassay der immunisierten Pferde**

Nachdem die Pferde nach dem beschriebenen Schema (siehe 3.1.2) immunisiert worden waren, wurde ihnen wöchentlich heparinisiertes Blut für T-Zell-Proliferationsassays entnommen. Die Proliferationsassays wurden mit cRALBP durchgeführt. Eine T-Zellreaktion auf cRALBP konnte bereits nach der 1. Immunisierung festgestellt werden, die durch die weiteren Immunisierungen noch etwas gesteigert wurden (siehe Abb. 10 und 11).

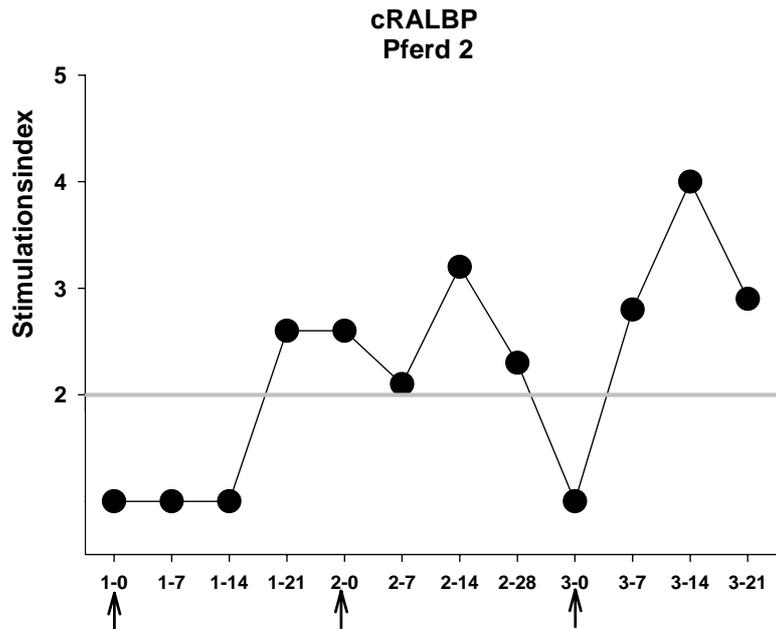


Abb. 10: Diese Abbildung zeigt die Proliferationsdaten des mit cRALBP immunisierten Pferdes Nr. 2. Die Pfeile kennzeichnen die 3 Immunisierungen im Abstand von 4 Wochen

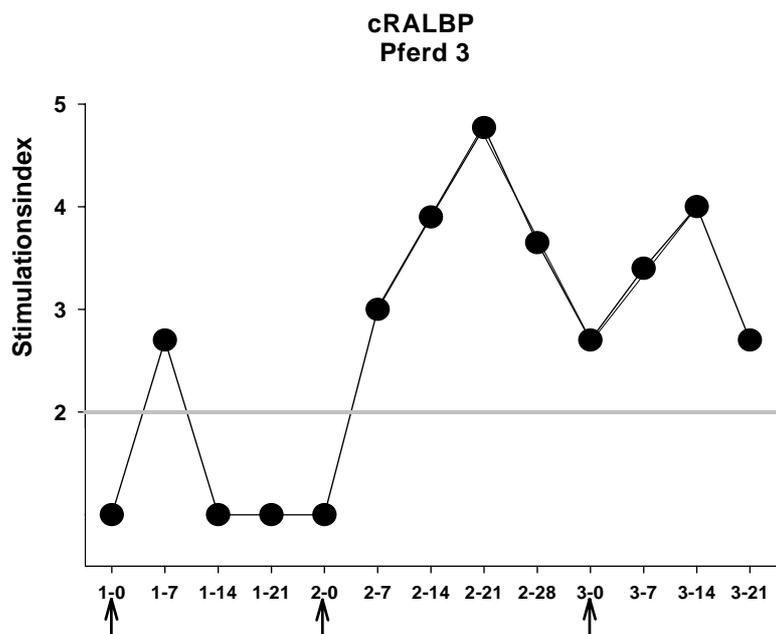


Abb. 11: Auf dieser Abbildung sind die Proliferationsdaten des mit cRALBP immunisierten Pferdes Nr. 3 gezeigt. Die Pfeile kennzeichnen die 3 Immunisierungen im Abstand von 4 Wochen.

## 4.4 Überprüfung der Uveitogenität von cRALBP im Ratten- und Pferdmodell

Zur Überprüfung der möglichen Uveitogenität eines zu charakterisierenden potenziellen Autoantigens ist es nötig, Tiere zu immunisieren, um anschließend zu überprüfen, ob eine pathologische Veränderung der Augen hervorgerufen werden kann.

Dazu wurden 9 Ratten in drei unabhängigen Versuchen mit cRALBP immunisiert. Sechs Ratten wurden mit je 200 µg nativem cRALBP in 100 µl FCA s.c. immunisiert, drei Ratten erhielten nur 75 µg nativ aufgereinigtes cRALBP in 75 µl FCA s.c. Allen neun Ratten wurden 0,2 ml abgetötete *B. pertussis* i.p. verabreicht. Nach 45 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und deren Augen sowohl histo- als auch immunhistologisch untersucht und nach dem Beurteilungsschema von Caspi beurteilt (Caspi et al. 1993). Zusätzlich wurden die B- und die T-Zellantwort untersucht. Zu jedem Versuch gab es je eine Kontrollratte, die mit BSA an Stelle von cRALBP immunisiert wurde. Ansonsten entspricht das Immunisierungsschema dem von mit cRALBP immunisierten Ratten. Eine weitere Kontrollgruppe waren 3 Ratten, die mit IL-12 p40 immunisiert wurden, welches im selben E.-coli-Stamm hergestellt wurde wie cRALBP und auf gleiche Art und Weise nativ aufgereinigt wurde, um sicher zu gehen, dass die Veränderungen der Augen und die positive Immunantwort nicht auf Rückstände aus der Herstellung von cRALBP zurückzuführen waren. Die Kontrollratten wurden zum gleichen Zeitpunkt euthanasiert wie die immunisierten Ratten, auch die Augen und die Immunantwort dieser Ratten wurden untersucht.

Von allen Ratten wurden die Milzen steril entnommen und anschließend ein Milzzellproliferationsassay durchgeführt.

Neben der Überprüfung im Rattenmodell wurde das uveitogene Potenzial auch im Pferdmodell dargestellt. Dazu wurden 2 Pferde (Pferd 2 und Pferd 3) 3-mal im Abstand von je vier Wochen mit je 500 µg nativem cRALBP in 0,5 ml FCA s.c. immunisiert. Zusätzlich wurde den Tieren 2 ml *B. pertussis* i.v. appliziert. 1 Pferd (Pferd 1) durchlief dasselbe Immunisierungsschema, wurde jedoch anstelle von nativ aufgereinigtem mit denaturiert aufgereinigtem cRALBP immunisiert. Während des Versuchs wurden die Tiere regelmäßig von fachkundigen Tierärzten klinisch untersucht. Nach der Euthanasie der Pferde wurden die Augen ebenfalls

histo- und immunhistologisch untersucht und beurteilt sowie deren B- und T-Zellantwort überprüft.

#### 4.4.1 B-Zellantwort der immunisierten Tiere

Um die Immunantwort der immunisierten Tiere auf das Antigen cRALBP zu überprüfen, wurde deren B-Zellantwort im ELISA-Verfahren überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle cRALBP immunisierten Ratten Autoantikörper gegen cRALBP gebildet hatten und die Seren der Ratten, die pathologische Veränderungen an der Retina erkennen lassen, eine höhere OD aufwiesen, als die Ratten, die einen geringeren Score im pathohistologischen Grading verzeichneten.

	<b>Experiment 1; Ratte 1- 3</b>	<b>Experiment 2; Ratte 1- 3</b>
<b>OD</b>	0,2520 $\pm$ 0,033	0,3430 $\pm$ 0,033
<b>Pathohistologischer Score</b>	1,2	1,5

*Tabelle 4: Zusammenhang zwischen OD aus ELISA und pathohistologischem Score*

Alle Kontrollratten blieben im ELISA negativ.

Bei allen 3 Pferden konnte durch die wöchentliche Entnahme von Serum ein Anstieg der Antikörper spätestens ab Tag 14 nach der zweiten Immunisierung nachgewiesen werden.

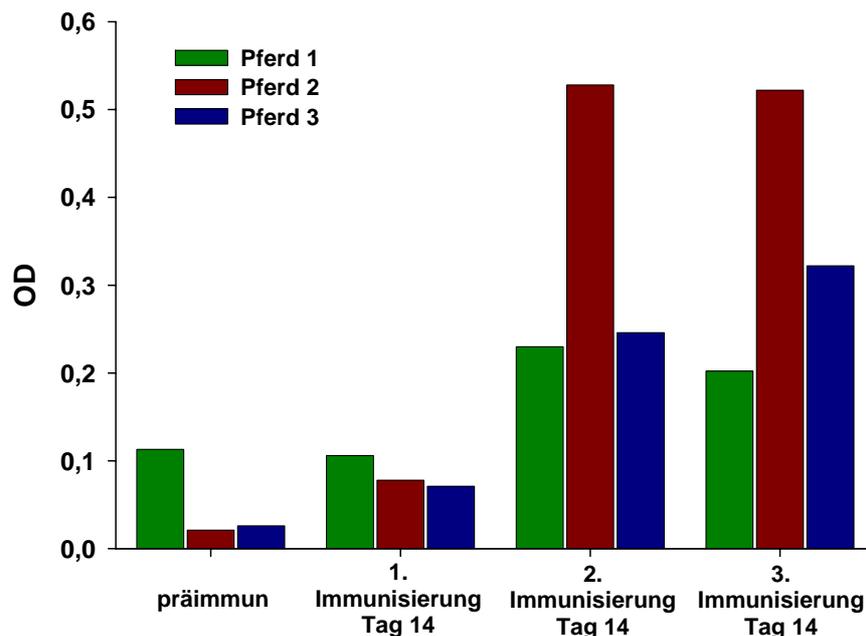


Abb. 12: Diese Abbildung zeigt die Entwicklung der cRALBP Antikörper der immunisierten Pferde vor und nach den drei Immunisierungen. Nach der zweiten Immunisierung zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Autoantikörpertiter in allen drei immunisierten Pferden.

Abbildung 12 zeigt graphisch die Entwicklung der Autoantikörper gegen cRALBP der immunisierten Pferde 1 – 3. Nach der ersten Immunisierung weist keines der Pferde einen Anstieg der Antikörper gegen cRALBP auf, jedoch alle ab Tag 14 nach der zweiten Immunisierung.

#### 4.4.2 Proliferation der Rattenmilzzellen

Nachdem die Ratten euthanasiert waren, wurde ihnen unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen. Aus dieser wurden anschließend Milzzellen isoliert und in Triplikaten auf 96-Loch-Flachbodenplatten kultiviert. Die Zellen wurden mit cRALBP kultiviert und nach fünf Tagen mit radioaktivem Thymidin markiert.

Als positiv wurde ein Stimulationsindex (SI) größer 2 gewertet. Alle 9 mit cRALBP immunisierten Ratten zeigten eine deutliche zelluläre Reaktion auf cRALBP im Vergleich zu den Kontrollratten. Zwar schwankten die absoluten Zahlen zwischen den Experimenten (siehe Tabelle 5), insgesamt wiesen die cRALBP immunisierten Ratten aber einen erhöhten Stimulationsindex im Vergleich zu den

Kontrollratten auf. In Experiment 1 kann im Vergleich zur Kontrollratte bei Ratte 1 ein ungefähr 13-fach erhöhter Stimulationsindex gezeigt werden. Auch in Experiment 2 kann im Vergleich zur Kontrollratte ein mindestens 13-fach erhöhter Stimulationsindex nachgewiesen werden. Bei Ratte 2 aus Experiment 2 ist der Stimulationsindex sogar 20-fach erhöht.

	<b>Exp. 1</b>	<b>Exp. 2</b>
	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>0,9</b>	<b>2,3</b>
<b>Ratte 1</b>	<b>13,7</b>	<b>26,7</b>
<b>Ratte 2</b>	<b>8,6</b>	<b>40,3</b>
<b>Ratte 3</b>	<b>9,0</b>	<b>26,7</b>

*Tabelle 5: Stimulationsindizes der Ratten im Milzzellproliferationsassay; Die cRALBP immunisierten Ratten zeigen eine Proliferation nach Stimulation mit cRALBP im Vergleich zu den BSA immunisierten Ratten.*

### **4.4.3 Histologische Ergebnisse**

#### **4.4.3.1 Ratten**

Bis auf ein Tier wiesen alle Ratten, die mit cRALBP immunisiert worden waren, Veränderungen in der Retina auf. Damit ergibt sich eine Uveitisinzidenz von 8/9. In den mit BSA immunisierten Kontrolltieren konnten keine pathologischen Veränderungen der Retina gezeigt werden. Auch die Gruppe Ratten, die mit IL-12 p40 immunisiert war, blieb pathologisch unauffällig. Um den Schweregrad der pathologischen Veränderung zu dokumentieren, wurden die histologischen Schnitte nach dem Beurteilungsschema von Caspi klassifiziert. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Einzelbefunde und den Score der pathohistologischen Veränderungen der Kontrollratten und der Versuchsratten.

<b>Tier</b>	<b>Pathohistologischer Befund</b>	<b>Score</b>
<b>Kontrollratte Experiment 1</b>	Keine pathologischen Veränderungen	0
<b>Kontrollratte Experiment 2</b>	Keine pathologischen Veränderungen	0
<b>Kontrollratte Experiment 3</b>	Keine pathologischen Veränderungen	0
<b>Gesamtscore</b>		0

*Tabelle 6: Einzel- und Gesamtscore der Kontrollratten, die mit BSA immunisiert wurden*

<b>Tier</b>	<b>Pathohistologischer Befund</b>	<b>Score</b>
<b>Kontrollratte 1 p40</b>	Keine pathologischen Veränderungen	0
<b>Kontrollratte 2 p40</b>	Keine pathologischen Veränderungen	0
<b>Kontrollratte 3 p40</b>	Keine pathologischen Veränderungen	0
<b>Gesamtscore</b>		0

*Tabelle 7: Einzel- und Gesamtscore der Kontrollratten, die mit IL-12 p40 immunisiert wurden*

<b>Tier</b>	<b>Pathohistologischer Befund</b>	<b>Score</b>
<b>Exp 1 Ratte 1</b>	Minimale Entzündungszeichen, die Architektur der Retina ist im Schnittbereich weitgehend intakt; Infiltration von Entzündungszellen in die Retina ohne Gewebeerstörung	0,5
<b>Exp 1 Ratte 2</b>	Mittelgradige Entzündung in mehr als ¼ der Retina, die bis zur inneren Körnerschicht reicht; exsudative	3

	Netzhautablösung	
<b>Exp 1 Ratte 3</b>	Keine pathologischen Veränderungen	0
<b>Exp 2 Ratte 1</b>	Fokale Bereiche der Zerstörung mit deutlichem Schwund der Photorezeptoren, Faltenbildung	1
<b>Exp 2 Ratte 2</b>	Mittelgradige Entzündung in mehr als $\frac{1}{4}$ der Retina, die bis zur inneren Körnerschicht reicht; exsudative Netzhautablösung	3
<b>Exp 2 Ratte 3</b>	Infiltration von Entzündungszellen in die Retina, Zerstörung der Photorezeptorenschicht in weniger als $\frac{1}{4}$ der Retina	0,5
<b>Exp 3 Ratte 1</b>	Hochgradige Entzündung und Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als $\frac{1}{4}$ der Retina	4
<b>Exp 3 Ratte 2</b>	Kleine exsudative Netzhautablösungen	2
<b>Exp 3 Ratte 3</b>	Große exsudative Netzhautablösungen	3
<b>Gesamtscore</b>		1,9

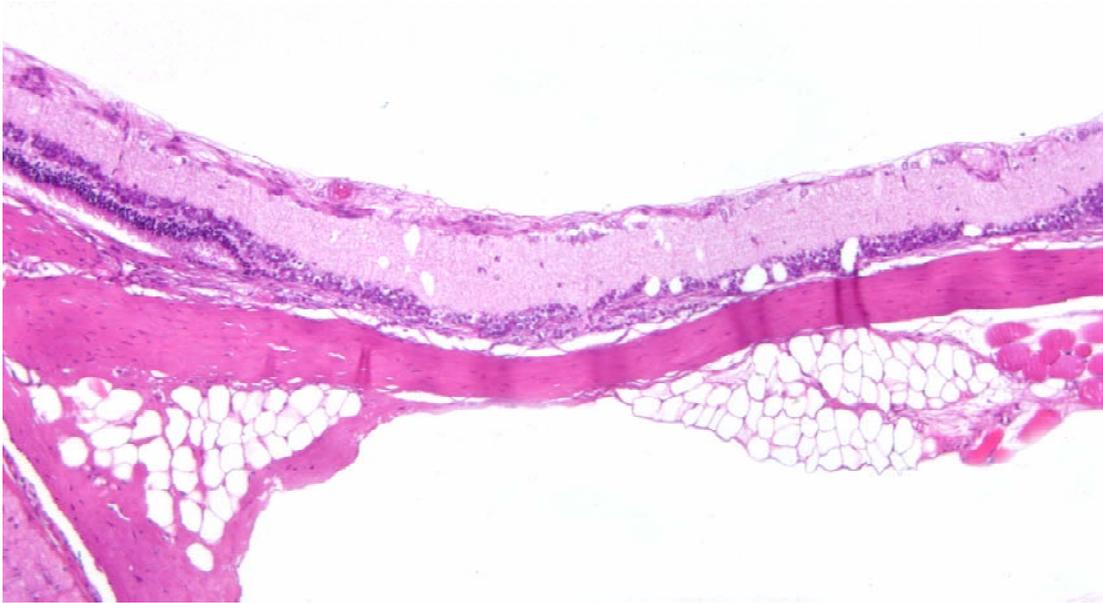
*Tabelle 8: Einzel- und Gesamtscore der mit cRALBP immunisierten Ratten. Acht von 9 immunisierten Ratten weisen pathohistologische Veränderungen im Sinne einer Uveitis auf*

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Veränderungen der immunisierten Ratten.

Ein häufiger Befund war die Zerstörung der retinalen Architektur (6/9) mit Verlust der Photorezeptoren und der äußeren Körnerschicht.

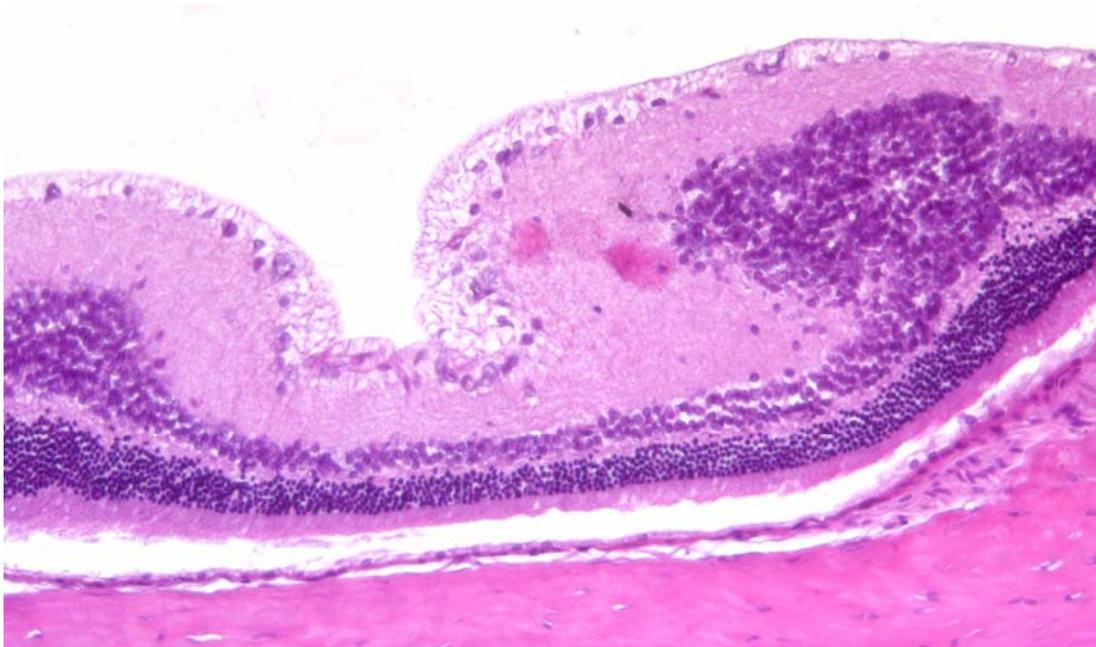
In der folgenden Abbildung (Abb. 13) kann von der Mitte des Bildes ausgehend bis zum linken Bildrand deutlich gezeigt werden, dass sich innere und äußere Körnerschicht nicht mehr unterscheiden lassen. In diesem Bereich sind auch

keine Photorezeptorzellen mehr nachweisbar. Fehlen diese, kann keine Reizweiterleitung mehr stattfinden und das Tier ist an dieser Stelle blind.



*Abb. 13: Exp. 2 Rt 2, HE, 20x Vergrößerung: zeigt deutlich den Übergang von normal geschichteter Retina in den pathologisch veränderten Bereich mit Verlust der Photorezeptoren*

Als Einzelbefund trat bei Ratte 1 aus Experiment 2 eine retinale Faltenbildung auf (siehe Abbildung 14). Wie man in dieser Abbildung erkennen kann, bildet sich in der Retina dieser Ratte eine deutliche Fältelung und eine Zunahme der Zellkerne der inneren Körnerschicht.



*Abb. 14 Exp. 2 Rt 1, HE, 20x Vergrößerung: diese Abbildung zeigt die Zerstörung der retinalen Architektur mit Faltenbildung im Auge*

Während der vorherrschende Befund der Umbau der retinalen Architektur war, fanden sich in einigen Schnitten (5/9) CD3<sup>+</sup> Entzündungszellen (Abbildung 15).

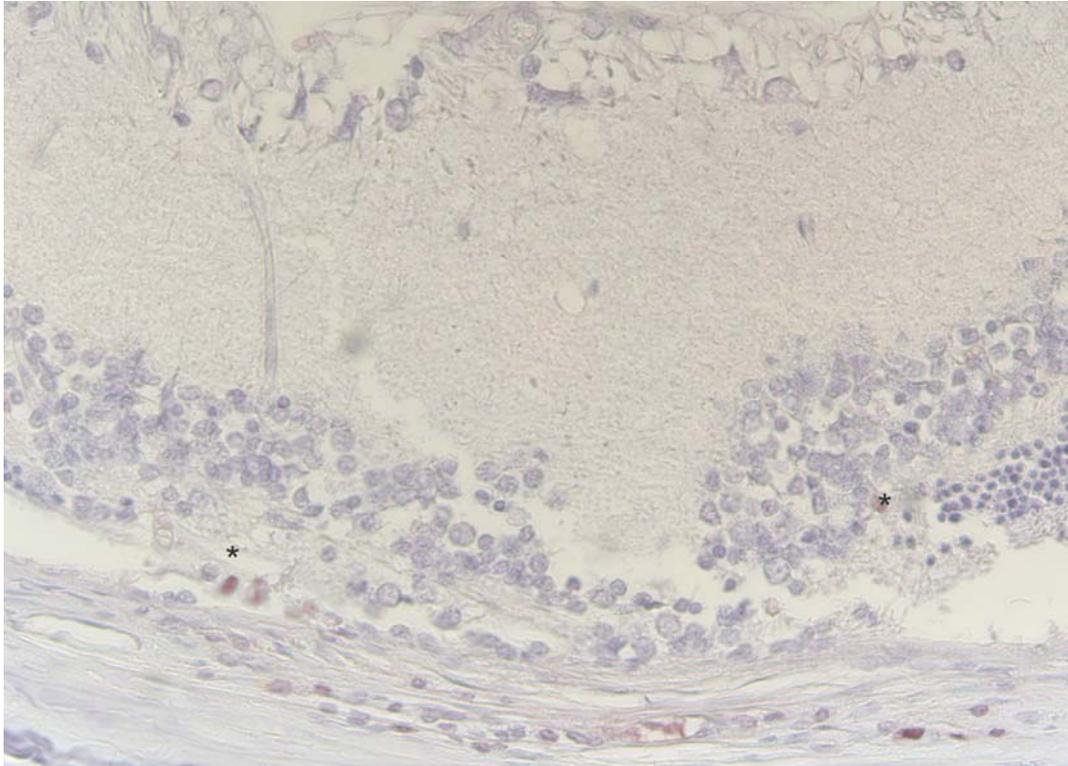


Abb. 15: Exp. 1 Rt 2, CD3-Färbung 40x Vergrößerung: Die Sterne kennzeichnen die CD3-positiven Zellen (braun)

Abbildung 15 zeigt die immunhistochemische CD3-Färbung (braun) auf der Zellen zu sehen sind, die bräunlich ummantelt sind.

#### 4.4.3.2 Pferde

Vor den Immunisierungen der Versuchspferde wurde das innere Auge von Tierärzten der Pferdeklunik der Ludwig-Maximilians-Universität München nach dem von Gerhards und Thureau beschriebenen Protokoll (Deeg et al. 2004) untersucht und bewertet. Dabei konnten bei keinem der Versuchstiere Anzeichen für eine bereits bestehende ERU oder entzündliche Veränderungen des inneren Auges festgestellt werden. Im Laufe des Versuchs wurden die klinisch-ophthalmologischen Untersuchungen der Pferde weiterhin von Tierärzten der Pferdeklunik durchgeführt, wobei den Untersuchern unbekannt war, ob die Pferde mit cRALBP immunisiert waren oder nicht.

Zwischen Tag 7 und Tag 14 nach der zweiten Immunisierung traten bei allen drei mit cRALBP immunisierten Pferden klinische Veränderungen auf. Dabei waren die klinischen Veränderungen bei Pferd 1 geringer als bei Pferd 2 und Pferd 3.

Die nachfolgenden Darstellungen zeigen den Schweregrad der klinischen Veränderungen der einzelnen Versuchspferde. Die Beurteilung der Veränderungen erfolgte im klinischen Bereich nach dem von Gerhards und Thureau entwickelten Beurteilungsschema (Deeg et al. 2004).

<b>Tier</b>	<b>Klinische Veränderung Linkes Auge</b>	<b>Klinische Veränderung Rechtes Auge</b>	<b>Score</b>
<b>Pferd 1</b>	<p><i>Tag 0:</i> keine Anzeichen einer entzündlichen Veränderung des Auges</p> <p><i>Tag 13 nach der 2. Immunisierung:</i> rauchige Trübung im dorsalen Bereich der Linse, auf der Linsenrückfläche Präzipitat; gelblicher Fundusreflex; temporal im Tapetum lucidum schwarzer Fleck; Sehnerv dorsal geringgradig gezackt</p> <p><i>Tag 21 nach der 3. Immunisierung:</i> rauchige Trübung im dorsalen Bereich der Linse größer als am Tag 13 nach der 2. Immunisierung;</p>	<p><i>Tag 0:</i> keine Anzeichen einer Veränderung des Auges</p> <p><i>Tag 13 nach der 2. Immunisierung:</i> geringgradiger gelblicher Fundusreflex</p> <p><i>Tag 21 nach der 3. Immunisierung:</i> geringe entzündliche Einlagerung im dorsalen Bereich des Glaskörpers</p>	

	Präzipitat auf der Linsenrückfläche; mittelgradige, entzündliche Einlagerung im dorsalen Glaskörper; dorsal der Papilla nervi optici geringgradig gezackt		
<b>Score Pferd 1</b>	0,7	0,4	<b>0,6</b>
<b>Pferd 2</b>	<p><i>Tag 0:</i> keine Anzeichen einer entzündlichen Veränderung des Auges</p> <p><i>Tag 14 nach der 2. Immunisierung:</i> seröser Tränenfluss und Miosis</p> <p><i>Tag 14 nach der 3. Immunisierung:</i> deutliche Schmerzhaftigkeit des Auges, Miosis</p> <p><i>Tag 27 nach der 3. Immunisierung:</i> deutliche Trübung des Glaskörpers</p>	<p><i>Tag 0:</i> keine Anzeichen einer entzündlichen Veränderung des Auges</p> <p><i>Tag 21 nach der 2. Immunisierung:</i> seröser Tränenfluss und Miosis</p> <p><i>Tag 14 nach der 3. Immunisierung:</i> Irisresiduen im temporalen Bereich der Linse</p> <p><i>Tag 27 nach der 3. Immunisierung:</i> 2 chorioretinale Narben nahe der Papilla nervi optici im Bereich von 11 und 5 Uhr</p>	
<b>Score</b>	0,5	0,6	<b>0,6</b>

Pferd 2			
Pferd 3	<p><i>Tag 0:</i> periphere Trübung der Linse; Papilla nervi optici rundum pigmentiert; keine Anzeichen einer bereits stattgefundenen entzündlichen Veränderung; Veränderungen im Sinne einer altersbedingten Degeneration</p> <p><i>Tag 7 nach der 2. Immunisierung:</i> im Vergleich zu Tag 0 vermehrte Auflagerung auf der Linsenrückfläche; mittelgradige, entzündliche Einlagerungen im Glaskörper</p> <p><i>Tag 14 nach der 2. Immunisierung:</i> Glaskörper geringgradig getrübt</p> <p><i>Tag 13 nach der 3. Immunisierung:</i> durch die deutlich vermehrte Katarakt und die hochgradige Trübung des</p>	<p><i>Tag 0:</i> periphere Trübung der Linse; Papilla nervi optici rundum pigmentiert; keine Anzeichen einer bereits stattgefundenen entzündlichen Veränderung; Veränderungen im Sinne einer altersbedingten Degeneration</p> <p><i>Tag 14 nach der 1. Immunisierung:</i> seröser Augenausfluß; geringgradiger gelblicher Fundusreflex</p> <p><i>Tag 7 nach der 2. Immunisierung:</i> im Bereich von 9 und 10 Uhr vermehrte, rauchige Trübung der Linse, ebenfalls vermehrte Auflagerung auf der Linsenrückfläche;</p>	

	Glaskörpers ist der Augenhintergrund nicht mehr beurteilbar	Glaskörper hochgradig verflüssigt, Einlagerungen durchscheinend <i>Tag 14 nach der 2. Immunisierung:</i> Glaskörper geringgradig getrübt <i>Tag 13 nach der 3. Immunisierung:</i> durch die deutlich vermehrte Katarakt und die hochgradige Trübung des Glaskörpers ist der Augenhintergrund nicht mehr beurteilbar	
<b>Score Pferd 3</b>	0,9	0,9	<b>0,9</b>
<b>Gesamtscore</b>			<b>0,7</b>

*Tabelle 9: Klinische Befunde beider Augen der mit cRALBP immunisierten Pferde sowie Einzel- und Gesamtscore der klinischen Veränderungen*

Nach Versuchsende erfolgte die pathohistologische Untersuchung. Die Veränderungen wurden dabei anhand des Schemas von Caspi (Caspi et al. 1993) beurteilt.

Dabei zeigte sich, das Pferd 1 eine retinale Vaskulitis entwickelte, während bei den Pferden 2 und 3 nachgewiesen wurde, dass ihre Retina durch die Uveitisschübe zerstört wurde.

<b>Tier</b>	<b>Pathohistologische Veränderung Linkes Auge</b>	<b>Patho- histologische Veränderung Rechtes Auge</b>	<b>Score</b>
<b>Pferd 1</b>	Retinale Vaskulitis	Retinale Vaskulitis	
<b>Score Pferd 1</b>	2	2	<b>2</b>
<b>Pferd 2</b>	Hochgradige Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als ¼ der Retina	Hochgradige Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als ¼ der Retina	
<b>Score Pferd 2</b>	4	4	<b>4</b>
<b>Pferd 3</b>	Hochgradige Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als ¼ der Retina	Hochgradige Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als ¼ der Retina	
<b>Score Pferd 3</b>	4	4	<b>4</b>
<b>Gesamtscore</b>			<b>3,3</b>

*Tabelle 10: Pathohistologische Befunde von linkem und rechtem Auge; Einzel- und Gesamtscore der mit cRALBP immunisierten Pferde*

Die gefundenen Veränderungen wurden im Vergleich zu gesunder Retina beurteilt (siehe Abb. 16).

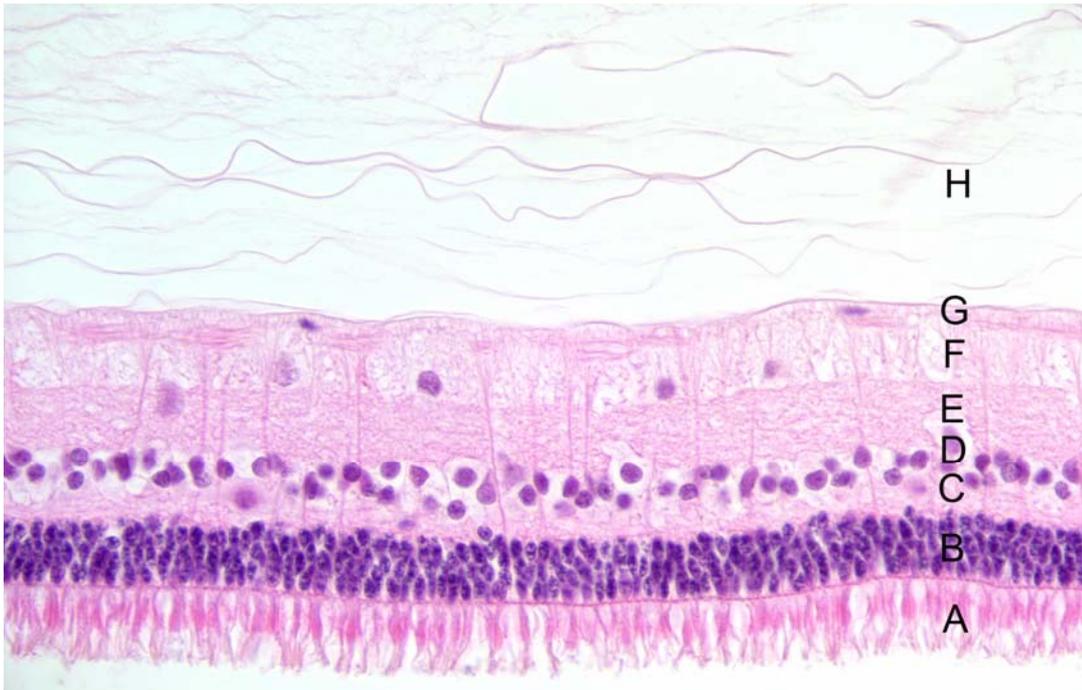
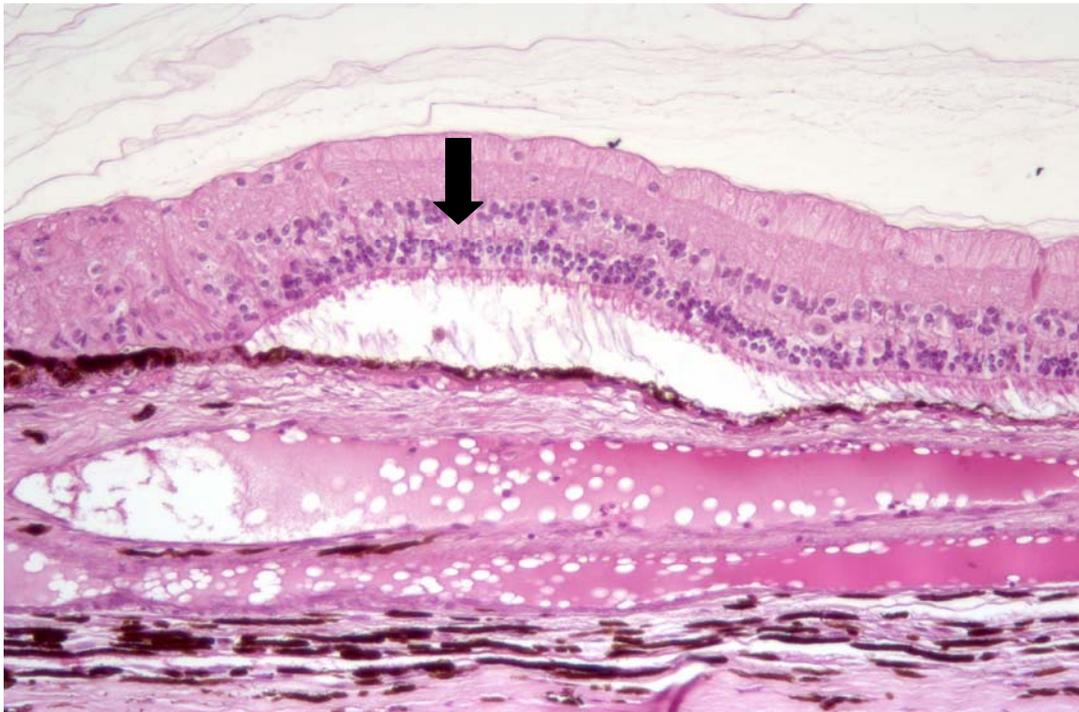


Abb. 16: (Pferd Kontrolle; HE; 40x) Diese HE-Färbung zeigt eine gesunde Retina

**A** Photorezeptorschicht; **B** Äußere Körnerschicht, bestehend aus den Zellkernen der Photorezeptorzellen; **C** Äußere plexiforme Schicht, axonale Fortsätze der Photorezeptorzellen (I. Neuron); **D** Innere Körnerschicht, Zellkerne der bipolaren Nervenzellen (II. Neuron); **E** Innere plexiforme Schicht, Axone der bipolaren Nervenzellen und dendritische Fortsätze der multipolaren Ganglienzellen; **F** Ganglienzellschicht, multipolare Ganglienzellen, III. Neuron; **G** Nervenfaserschicht, Neuriten der Ganglienzellen **H** Glaskörper

#### 4.4.3.2.1 Pferd 1

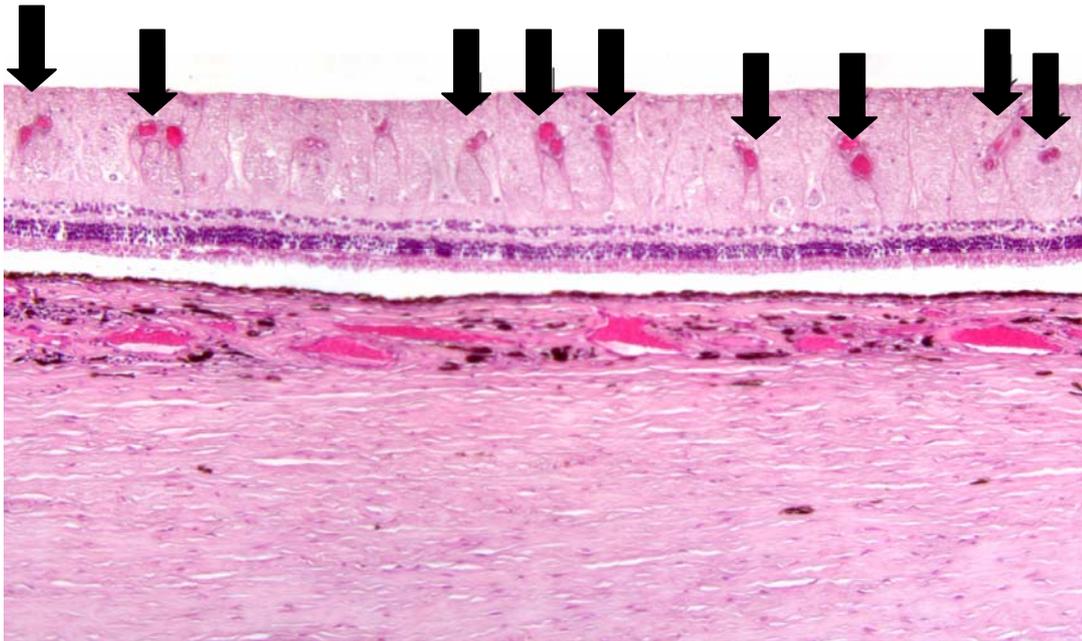
Die pathohistologischen Befunde von Pferd 1 zeigen sich in einem Verlust von Photorezeptoren und der gehäuften Bildung von neuen retinalen Gefäßen. In der folgenden Abbildung (Abbildung 17) kennzeichnet der Pfeil die Stelle, an der die Photorezeptoren durch Uveitisschübe zerstört wurden. Ohne die Existenz von Photorezeptoren ist die optische Reizweiterleitung nicht mehr möglich und die Pferde sind an dieser Stelle blind. Dieser gezeigte Befund war typisch für alle cRALBP-immunisierten Pferde.



*Abb 17: Pferd 1, HE, 20x Vergrößerung; an der gekennzeichneten Stelle (↓) ist die Veränderung der Retina mit Zerstörung der Photorezeptoren zu sehen*

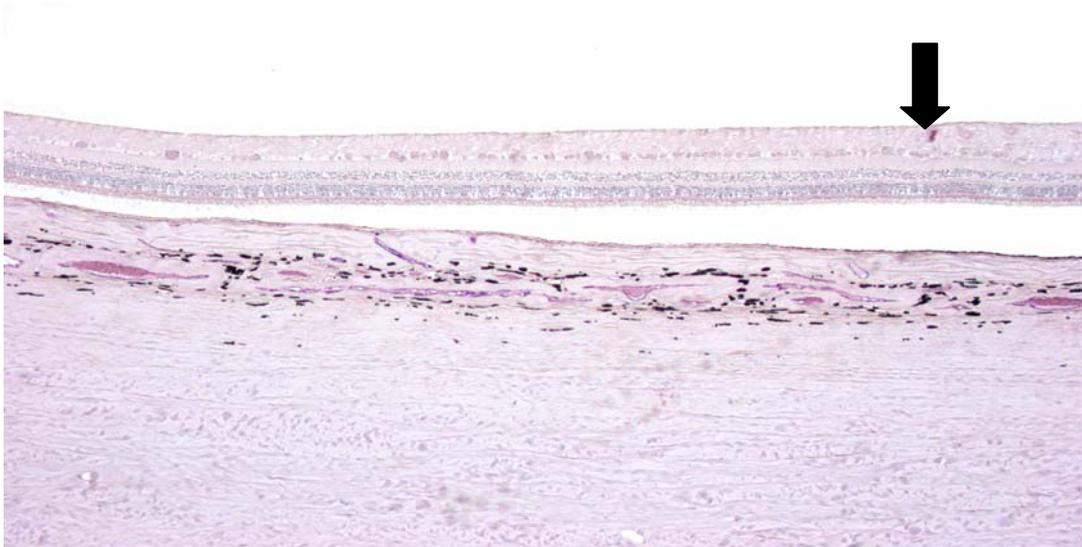
Der hervorstechende pathohistologische Befund bei Pferd 1 war eine Vaskulitis mit deutlicher Zunahme der retinalen Gefäße (siehe Abbildung 18 und 20) und Neovaskularisation (Abbildung 21).

Die Pfeile in Abbildung 18 kennzeichnen die hohe Anzahl retinaler Gefäße in dieser HE-Färbung, die im Vergleich zu einer gesunden Retina deutlich erhöht sind.



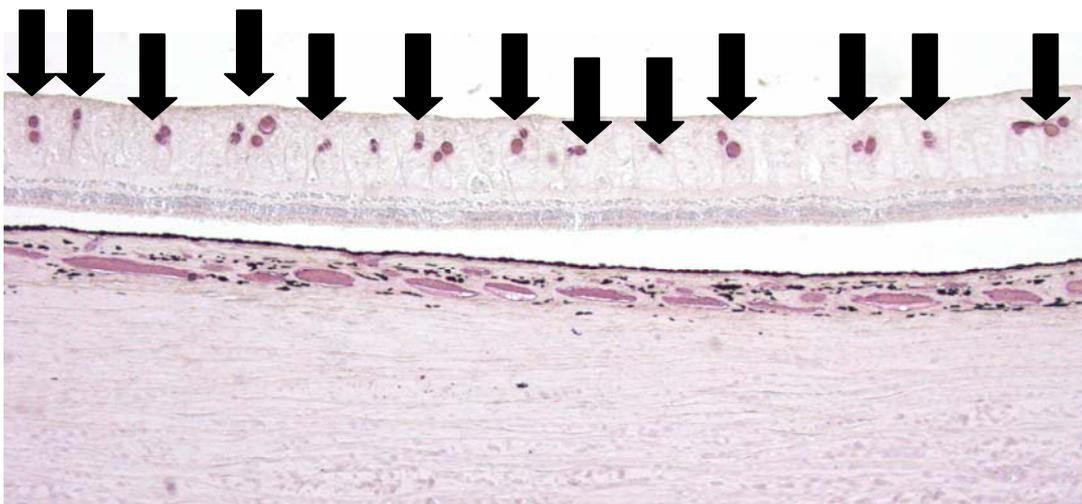
*Abb: 18 Pferd 1, HE, 10x Vergrößerung; die Pfeile kennzeichnen die große Anzahl retinaler Gefäße*

Um den deutlichen Unterschied bei der Anzahl der retinalen Gefäße zu zeigen, wurde eine Kontrollretina mit vWF gefärbt. Bei dieser immunhistochemischen Färbung werden alle Gefäße angefärbt, da sich von-Willebrand-Faktor in den Endothelien der Gefäße befindet. Abbildung 19 zeigt eine gesunde Retina. Der Pfeil kennzeichnet das violett gefärbte Gefäß.



*Abb. 19: Kontrollretina, vWF, 10x Vergrößerung; gesunde Pferderetina mit einem Blutgefäß*

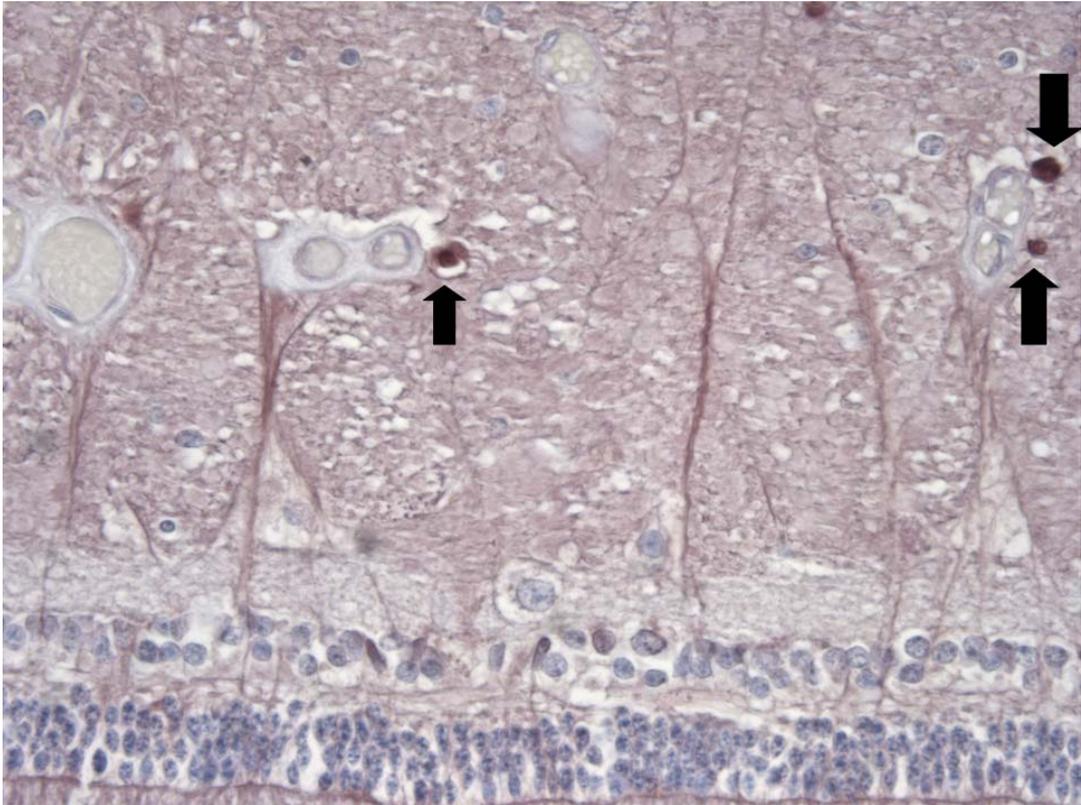
In der in Abbildung 20 gezeigten vWF-Färbung zeigt sich die deutliche Zunahme der retinalen Gefäße in Pferd 1 nach Immunisierung mit cRALBP. Diese liegen nicht nur in erhöhter Anzahl vor, sondern zeigen sich auch in Doppelreihen.



*Abb.20: Pferd 1, vWF, 10x Vergrößerung; Diese Abbildung zeigt die deutlich erhöhte Anzahl retinaler Gefäße (violett) nach Immunisierung mit cRALBP*

Um letztlich ganz sicher zu gehen, dass es sich bei den Gefäßen um neugebildete Gefäße handelte, wurden die histologischen Schnitte von Pferd 1 zusätzlich zu der vWF-Färbung mit dem Neoangioblastenmarker VEGF untersucht. Dieser Marker färbt selektiv Neoangioblasten. In Abbildung 21 können dabei im ausgewählten Schnittbereich drei VEGF-positive Gefäße gezeigt

werden, die auf eine Neubildung der Gefäße auf Grund einer Entzündung der Retina schließen lassen.



*Abb. 21: Pferd 1, VEGF, 40x Vergrößerung; die Pfeile kennzeichnen VEGF, das Neoangioblasten neben 3 Gefäßen markiert hat*

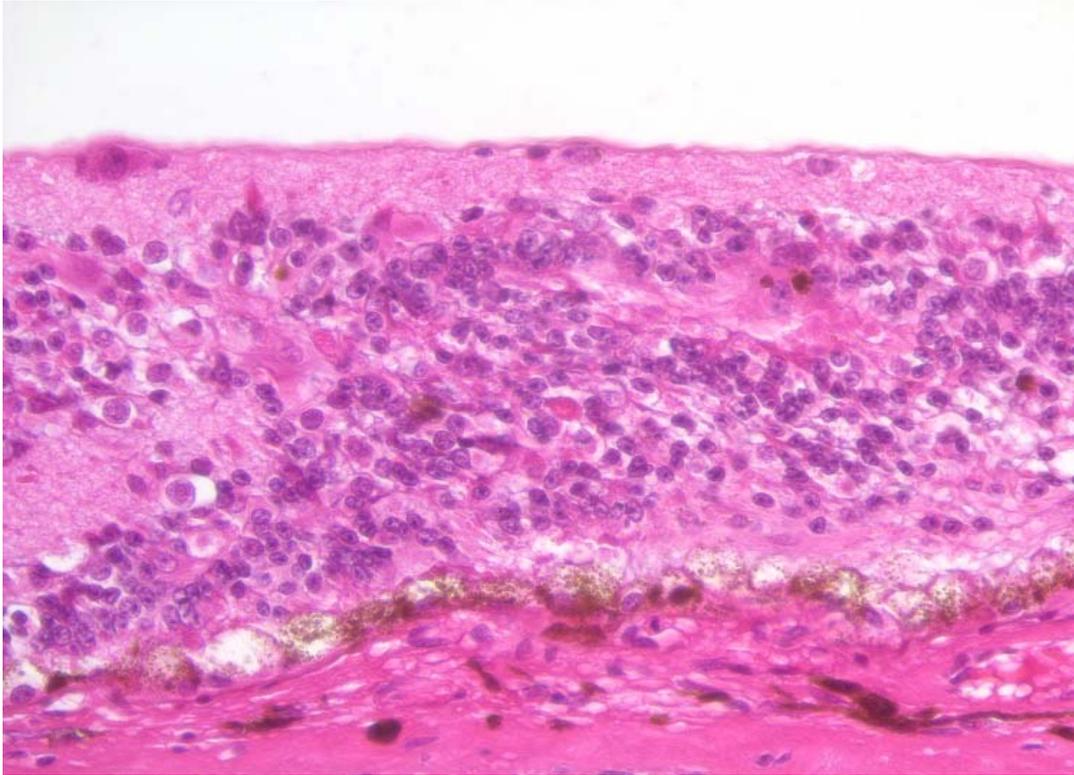
#### **4.4.3.2.2 Pferd 2**

Die pathohistologischen Veränderungen von Pferd 2 zeigen sich in einer hochgradigen Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als einem Viertel der Retina. In Abbildung 22 zeigt sich die Ablösung der Retina mit einhergehender Faltenbildung. Im Gegensatz zur Faltenbildung in der Ratte (siehe Abbildung 14) treten hier vermehrt Zellkerne in der äußeren Körnerschicht der Retina auf.



*Abb. 22: Pferd 2; HE; 10x Vergrößerung; diese Abbildung zeigt die hochgradige Zerstörung der retinalen Architektur mit Faltenbildung im Auge von Pferd 2*

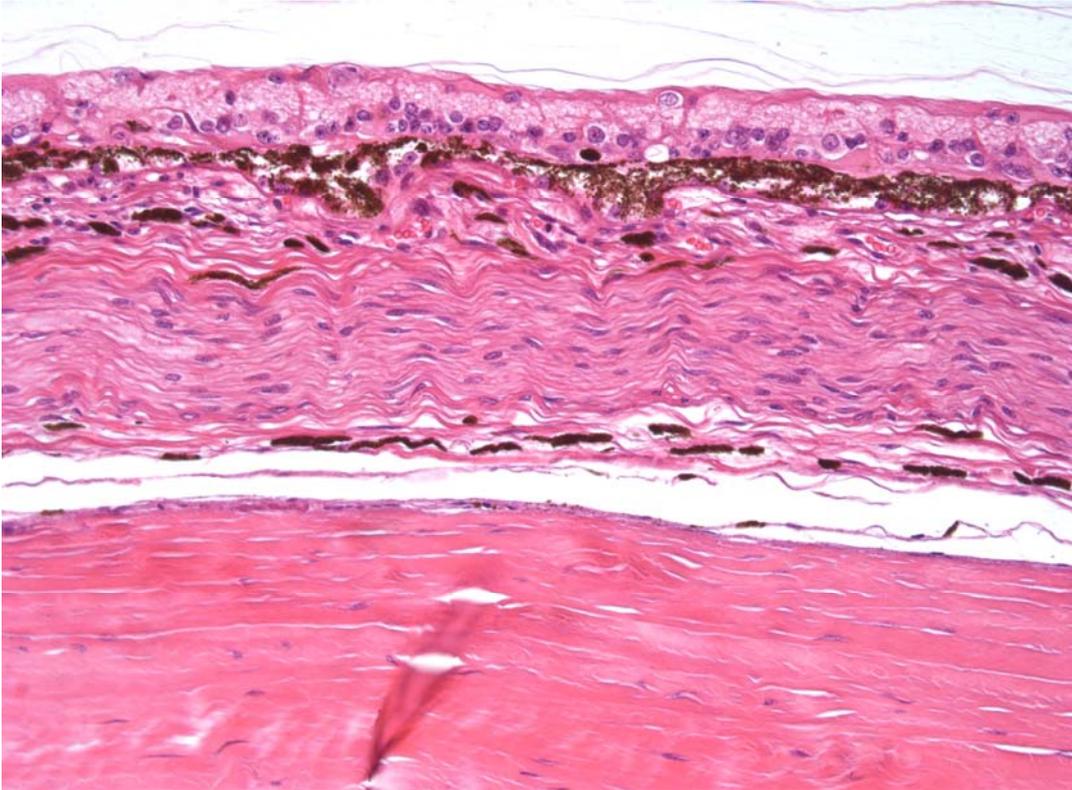
Abbildung 23 zeigt wie hochgradig verändert die Retina in weiten Bereichen der Retina erschien. In diesem Schnitt ist keine retinale Architektur mehr erkennbar, die einzelnen Schichten sind ineinander verschwommen und nicht mehr klar definierbar. Photorezeptoraussensegmente sind nicht mehr vorhanden, das Auge ist in diesem Bereich erblindet. Betrachtet man das Retinale Pigmentepithel, so erkennt man die löchrige Struktur der zerstörten Blut-Retina-Schranke.



*Abb. 23: Pferd 2; HE; 40x Vergrößerung; hochgradig zerstörte Retina; die einzelnen Retinaschichten sind nicht mehr erkennbar*

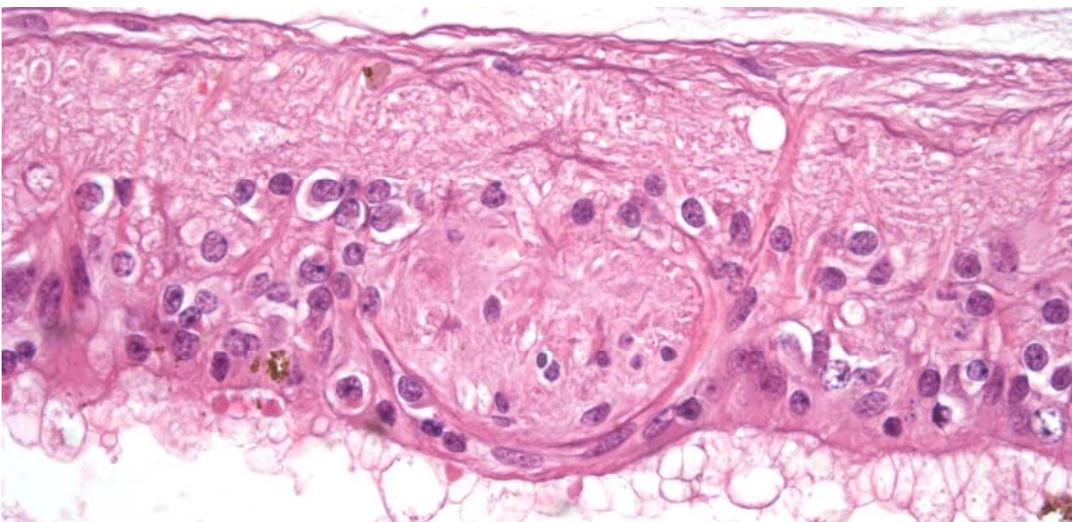
#### **4.4.3.2.3 Pferd 3**

Auch die pathohistologischen Veränderungen von Pferd 3 zeigen sich in einer hochgradigen Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als einem Viertel der Retina. In Abbildung 24 wird das hochgradige Ausmaß der Zerstörung der Retina sichtbar. Einzelne retinale Schichten sind verschwunden, die Retina ist verschmälert, die Photorezeptoraußensegmente fehlen ganz, das Pferd ist somit erblindet.



*Abb. 24: Pferd 3, HE, 10x Vergrößerung; hochgradig zerstörte Retina; die einzelnen Retinaschichten sind nicht mehr erkennbar*

Auch in dieser Abbildung (Abb. 25) ist der deutliche Umbau der retinalen Architektur erkennbar. Im zentralen Bildbereich ist eine Narbenbildung zu sehen, Photorezeptoraußensegmente fehlen, wie auch in Abbildung 24, ganz.

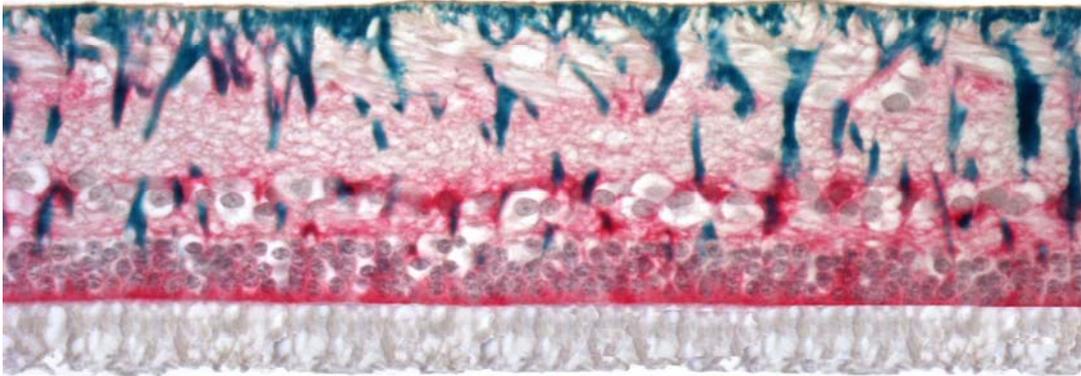


*Abb. 25: Pferd 3, HE, 40x Vergrößerung; hochgradig zerstörte Retina; die einzelnen Retinaschichten sind nicht mehr erkennbar*

Nachdem sich allen immunisierten Pferden gezeigt hatte, dass die cRALBP exprimierenden Photorezeptorzellen angegriffen wurden, sollten auch die cRALBP exprimierenden Müllerzellen näher untersucht werden.

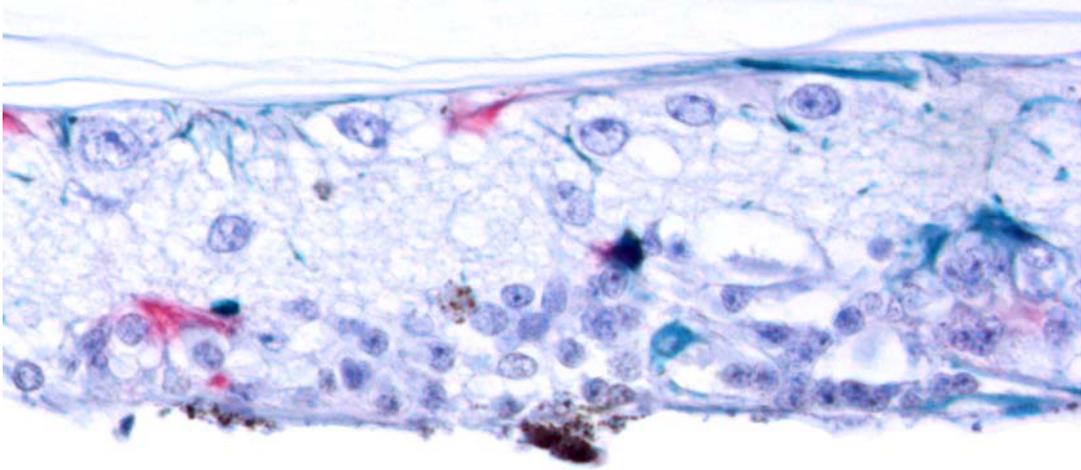
Um mögliche Strukturveränderungen besser ansprechen zu können, wurden die Müllerzellen immunhistochemisch dargestellt. Dabei erwiesen sich GFAP (grün-blau) und GS (rot) als Pferde-Müllerzellspezifisch.

In Abbildung 26 kann durch die GFAP-GS-Doppelfärbung deutlich der Verlauf der Müllerzellen in der Retina verfolgt werden.



*Abb. 26 Diese Abbildung zeigt eine gesunde Retina mit GFAP (blau-grün)-GS (rot)-Doppelfärbung der Müllerzellen.*

Durch die Müllerzellfärbung konnte die Zerstörung dieser Zellpopulation neben den Photorezeptorzellaussensegmenten nachgewiesen werden. In Abbildung 27 können keine Müllerzellen mehr erkannt werden.



*Abb. 27: Pferd 3; GFAP(blau-grün)-GS(rot)-Doppelfärbung; 40x Vergrößerung; auf dieser Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass in hochgradig veränderten Bereichen keine Müllerzellen mehr vorhanden sind.*



## 5 Diskussion

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist als schwerwiegende Erkrankung des Pferdeauges anzusehen. Mit fortschreitender Entzündungsdauer führt sie meist unweigerlich zum Verlust der Sehkraft eines oder beider Augen. Sind beide Augen betroffen, hat dies meist die Tötung des Tieres zur Folge. In vielen Regionen der Erde ist die equine rezidivierende Uveitis der Hauptgrund für die Erblindung des Pferdes (Rebhun 1999; Spiess 1997).

Obwohl seit langer Zeit an der Ätiologie und Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis geforscht wird, sind sie bislang noch nicht geklärt. Zwei Theorien, die intraokuläre Leptospireninfektion und ein autoimmun-vermitteltes Geschehen, stellen die momentanen Erklärungsversuche für die equine rezidivierende Uveitis dar. Bislang gilt es als nicht widerlegt, dass die intraokuläre Leptospireninfektion als Auslöser an der equinen rezidivierenden Uveitis beteiligt ist. Einige Autoren vermuten, dass, neben Einflüssen aus der Umwelt, eine auslösende Infektionserkrankung zur Induktion einer Autoimmunerkrankung notwendig ist (Albert & Inman 1999; Fujikawa & Haugen 1990). So ist auch der momentane Stand der Psoriasis vulgaris Forschung der, dass eine persistierende Streptokokkenangina eine autoimmun-vermittelte Psoriasis vulgaris auslösen kann (Prinz 2004). Erklärt werden kann dies durch den Mechanismus der molekularen Mimikry. Vermutet wird, dass bei diesem Vorgang das infektiöse Agens eine Reihe von antigenen Strukturen besitzt, die eine antigenetische Ähnlichkeit mit dem Wirtsgewebe aufweisen. Wird dieses Pathogenepitop vom MHC-Komplex präsentiert, kann es passieren, dass autoreaktive T-Zellen aktiviert werden (Prinz 2004). Als Konsequenz davon bricht die Toleranz gegen körpereigene Peptide zusammen und die gegen das Pathogen gerichtete Immunantwort richtet sich auch gegen körpereigenes Gewebe und verursacht dort dann einen meist erheblichen Schaden (Oldstone 1987).

Mit einer intraokulären Infektion alleine ist der rezidivierende Charakter dieser Erkrankung jedoch nicht zu erklären (Nussenblatt 1991). Auch das Ansprechen auf cortisonhaltige Augensalben (Hines 1984; Spiess 1997; Winterberg 1997) und die Tatsache, dass es sich bei der ERU um eine rezidivierende lymphozytäre Entzündung des Auges handelt (Deeg et al. 2002a; Dubielzig et al. 1997; Gilger et al. 1999; Kalsow et al. 1992; Romeike et al. 1998) stützen die These eines

autoimmun-vermittelten Geschehens (Nussenblatt 1991). 1999 untersuchte Kalsow die Pinealdrüsen von ERU-kranken Pferden und verglich sie mit den Pinealdrüsen von gesunden Pferden (Kalsow et al. 1999). Dabei stellte sie fest, dass an ERU erkrankte Pferde neben der Augenentzündung selektiv an einer Pinealitis erkrankt waren. Die Pinealdrüse exprimiert neben cRALBP auch noch andere retinale Proteine. Diese Ergebnisse zeigen eine Beschränkung der Entzündung auf die Gebiete, die Uveitisautoantigene (IRBP, S-Ag, cRALBP) exprimieren. Gestützt wird diese Tatsache durch die Erkenntnis aus Versuchen mit anderen Tiermodellen, die eine Mitbeteiligung der Pinealdrüse nach Uveitisinduktion zeigten (Caspi et al. 1986; Chader 1989; Chan et al. 1990; Chan et al. 1988; Gery et al. 1986a; Gery et al. 1986b; Kalsow & Wacker 1977; Kalsow & Wacker 1978; Mochizuki et al. 1985; Nussenblatt 1991). Andere Arbeiten zur ERU zeigen einen Zusammenhang zwischen Autoimmunreaktionen und ERU (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2002a; Deeg et al. 2002b; Deeg et al. 2004). Zuletzt ergaben sich Hinweise auf eine Beteiligung weiterer Autoantigene an der ERU (Pompetzki 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche pathophysiologische Relevanz des entdeckten potenziellen Autoantigens cRALBP (Pompetzki 2003) zu untersuchen.

Witebsky orientierte sich 1957 an den Henle-Kochschen-Postulaten, als er seine drei Postulate zur Erfüllung der Definition eines Autoantigens veröffentlichte (Witebsky et al. 1957). Seinen Postulaten folgend muss ein Autoantigen folgende Voraussetzungen erfüllen: das zu charakterisierende Autoantigen muss bekannt sein, es müssen eine zelluläre Immunantwort und/oder Autoantikörper gegen das körpereigene Antigen vorliegen und eine Immunisierung mit dem Antigen muss die Erkrankung auslösen.

Das erste Postulat, nämlich dass das Autoantigen bekannt sein muss, wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit bearbeitet (Pompetzki 2003).

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurden zu Beginn dieser Arbeit ERU-Patienten auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen cRALBP untersucht.

Dazu wurde als erstes die B-Zellantwort in Massenscreeningtests untersucht. Um diese Tests durchführen zu können, war es nötig, cRALBP in großen Mengen zur

Verfügung zu haben. Da eine Aufreinigung von cRALBP aus Rinderaugen sehr umständlich ist und Rinderaugen seit dem Auftreten von BSE zum Hochrisikomaterial zählen und deswegen nicht mehr abgegeben werden dürfen, erschien dieser Weg der Proteingewinnung als unmöglich. Deswegen wurde auf die rekombinante Herstellung des Proteins zurückgegriffen. Die Durchführung der Arbeit mit rekombinant hergestelltem Protein hätte jedoch auch missglücken können. Das Protein hätte toxisch, falsch glykosiliert oder falsch gefaltet sein können (persönliche Mitteilung Wildner). Obwohl die Aufreinigung funktionierte, gab es bei den ersten ELISAs zur Detektion von Autoantikörpern gegen cRALBP Schwierigkeiten, als LPS verunreinigtes cRALBP verwendet wurde. Die Ergebnisse lieferten sowohl in den Kontrollen als auch in den ERU-Seren viele falschpositive Ergebnisse. Diese falschpositiven Ergebnisse können auf Reaktionen gegen E.-coli-Bestandteile, die an LPS gebunden sind, zurückgeführt werden, da häufig Antikörper gegen kommensale E. coli aus der Darmflora vorliegen (Gharavi et al. 1988). Dieses Problem wurde dadurch gelöst, dass LPS-freies cRALBP verwendet wurde, indem bei der rekombinanten cRALBP-Herstellung LPS mittels eines chromatographischen Systems entfernt wurde. Diese Entfernung war erfolgreich, wie ein durchgeführter Bio-Assay beweist. In den nun durchgeführten ELISAs zeigte sich, dass von den 289 untersuchten ERU-Patienten 29,1 % einen erhöhten Serumtiter gegen cRALBP im ELISA aufwiesen. Die 95 untersuchten Kontrollpferde waren mit 11,6 % positiv auf cRALBP. Die Prävalenz der Autoantikörper-Positiven in der ERU-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen zeigt einen hochsignifikanten Unterschied (CHI-Quadrat-Test Autoantikörper-Positiv ERU > Autoantikörper-Positiv Kontrollen;  $p < 0,001$ ).

Um gänzlich sicher zu gehen, dass die cRALBP-positiv getesteten Seren tatsächlich cRALBP detektierten, wurden Seren im Immunoblot nochmals verifiziert, um falsch-positive Ergebnisse, die durch Reaktion auf ein unrelevantes Antigen entstanden, ausschließen zu können. Die Ergebnisse aus dem ELISA und dem Immunoblot lieferten eindeutige Hinweise auf eine erhöhte Autoantikörperantwort gegen cRALBP bei der equinen rezidivierenden Uveitis. Knapp ein Drittel der untersuchten Patienten zeigt eine deutlich nachweisbare Immunantwort auf dieses Protein. Ungeklärt ist bis dato jedoch, ob es sich bei diesen positiven Patienten um eine spezielle „cRALBP-Untergruppe“ der equinen

rezidivierenden Uveitis handelt, oder ob das Protein Bestandteil des Epitop Spreading-Mechanismus ist. Von weiterem Interesse sind die 11,6 % positiv getesteten Pferde aus der Kontrollgruppe. Hier stellt sich die Frage, ob diese Tiere eventuell in nicht absehbarer Zeit doch eine equine rezidivierende Uveitis entwickeln und diese positive Reaktion als „Vorbote“ einer bevorstehenden Uveitis gewertet werden kann.

Um das Vorliegen intraokulärer Autoantikörper zu untersuchen, wurden auch die durch die Pars-plana-Vitrektomie gewonnenen Glaskörperspülproben zusätzlich untersucht. Dabei konnten die Glaskörperspülproben von 326 an ERU erkrankten Pferden getestet werden. Davon waren 19 % der Patienten positiv auf cRALBP. Keines der 10 Kontrollpferde konnte dabei eine positive OD im ELISA aufzeigen. Die 19 % positiven Patienten lassen, wie schon im Serum-ELISA erkennbar, einen eindeutigen Schluss auf die Beteiligung von cRALBP an der equinen rezidivierenden Uveitis zu. Keines der Kontrollpferde wies intraokuläre Autoantikörper auf, allerdings besitzen gesunde Pferde keine zerstörte Blut-Retina-Schranke. Somit ist es nicht wahrscheinlich, dass sich Autoantikörper im Glaskörper befinden. Obwohl auch in diesem ELISA ein Trend zur Beteiligung von cRALBP an der ERU zu erkennen ist, ist der geringe Stichprobenumfang von 10 Kontrollen noch problematisch und verhindert eine statistische Auswertung. Deshalb sollte versucht werden, die Anzahl der Kontrollproben aus gesunden Augen zu erhöhen, um eine statistisch gesicherte Aussage treffen zu können. Ein Hindernis bei der Bewältigung dieses Problems liegt jedoch in der Beschaffung von Glaskörperspülproben gesunder Pferde.

Um eine Unterscheidung zwischen einer vermeintlichen „cRALBP-Untergruppe“ oder einem Epitop Spreading zu ermöglichen, wurde die B-Zellantwort von 54 Pferden auf die Autoantigene S-Ag, IRBP und cRALBP untersucht. Rekrutiert wurden diese Patienten aus der Gruppe cRALBP-positiv getesteter Pferde. Zusätzlich wurden zufällig ausgewählte cRALBP-negativ getestete Pferde mit untersucht. Dabei reagierten 5,5 % nur auf cRALBP, 16,6 % nur auf IRBP und 11,1 % nur auf S-Ag. Auf alle 3 Antigene gemeinsam reagierten 29,6 %. Auf die Kombination von cRALBP und IRBP sowie auf die von cRALBP und S-Ag je 1,9 %. Die beiden Antigene IRBP und S-Ag gemeinsam erkannten 33,3 % der Patienten. Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine Beteiligung von cRALBP am Epitop Spreading. Ob es eine „cRALBP-Untergruppe“ gibt oder nicht, kann zu

diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht geklärt werden. Da 5,5% der getesteten Pferde nur anti-cRALBP-Autoantikörper aufweisen, kann die Existenz einer „cRALBP-Untergruppe“ nicht ausgeschlossen werden. Es kann jedoch auch sein, dass cRALBP in der Hierarchie der Rekrutierung neuer Autoantigene im Mechanismus des Epitop Spreading an erster Stelle steht und diese 5,5% cRALBP-positiven Pferde am „Anfang“ der Krankheit ERU stehen. Somit hätten sie noch keine andere Autoreaktivität gegen die Autoantigene IRBP oder S-Ag. Da auch noch nicht geklärt ist, ob es noch weitere, bis jetzt unbekannte Autoantigene in der ERU gibt und über die Hierarchie der Rekrutierung neuer Autoantigene noch keine Erkenntnisse vorliegen, sind ergänzende Studien zu dieser speziellen Fragestellung durchzuführen.

Interessant war die Frage, ob autoreaktive T-Zellen gegen cRALBP detektiert werden konnten, da es sich bei der ERU um eine T-Zellvermittelte Erkrankung handelt (Deeg et al. 2001). Deshalb wurden in dieser Arbeit auch die T-Zellantworten von 20 ERU-Patienten und 10 Kontrollpferden mittels eines T-Zellproliferationsassays untersucht. Von den 20 ERU-Patienten wurden 6 Pferde positiv auf cRALBP getestet. Keines der Kontrollpferde proliferierte auf cRALBP oder ein anderes getestetes Antigen. Diese Ergebnisse zeigen wieder die Beteiligung von cRALBP an der equinen rezidivierenden Uveitis.

Um zu überprüfen, ob cRALBP am Epitop Spreading teilnimmt oder ob eine „cRALBP-Untergruppe“ existiert, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde die T-Zellantwort von 10 ERU-Pferden und 5 Kontrollpferden über einen Zeitraum von 17 Monaten beobachtet. Keines der 5 Kontrollpferde zeigte eine Proliferation auf eines der getesteten Antigene. Dafür konnte bei zwei der 10 ERU-Patienten ein intermolekulares Epitop Spreading mit Beteiligung von cRALBP nachgewiesen werden.

Pferd Nummer 1 („Cricket“) zeigte im März 2003 einen positiven Stimulationsindex auf PI 731 (Peptid von IRBP). Im Mai 2003 konnte ein intramolekulares Spreading auf das Antigen R14 (Peptid von IRBP) nachgewiesen werden. Während eines akuten ERU-Schubes im Dezember 2003 reagierte der Patient sowohl auf PDIRBP (Peptid von IRBP) als auch auf S-Ag und zeigt somit abermals sowohl ein intramolekulares Spreading innerhalb von IRBP als auch ein intermolekulares Spreading von IRBP nach S-Ag. Im April 2004

konnte ein intermolekulares Spreading zum Protein cRALBP dargestellt werden. Die letzte proliferative Aktivität zeigte dieser Patient während eines erneuten ERU-Schubes im Juli 2004 auf die Antigene S-Ag 286 (Peptid von S-Ag) und PDIRBP (Peptid von IRBP). Somit fand nochmals ein intermolekulares Spreading statt, von cRALBP auf S-Ag286.

Bei Pferd Nummer 2 („Roger“) konnte innerhalb der 17 Monate ebenfalls sowohl intra- als auch intermolekulares Spreading dargestellt werden. Im Mai 2003 reagierte dieser ERU-Patient auf das Antigen S-Ag 281 (Peptid von S-AG). Im August 2003 proliferierte dieses Pferd sowohl auf S-Ag als auch auf PDIRBP (Peptid von IRBP). Somit fand in dieser Zeit sowohl intramolekulares Spreading von S-Ag 281 (Peptid von S-AG) nach S-Ag als auch intermolekulares Spreading von S-Ag 281 (Peptid von S-AG) nach PDIRBP statt. Im Oktober 2003 reagierte „Roger“ schließlich nach erfolgtem intramolekularem Spreading auf PI 731 (Peptid von IRBP), während er im April 2004 abermals auf PDIRBP (Peptid von IRBP) proliferierte. Während eines Schubes im Juli 2004 proliferierte dieses Pferd auf die Antigene Peptid M (Peptid von S-Ag) und cRALBP und weist dadurch zweimaliges intermolekulares Spreading auf. Zwei der verbleibenden acht ERU-Pferde zeigten intramolekulares Epitop Spreading innerhalb des Proteins S-Ag. Bei den verbleibenden 6 ERU-Pferden konnte ein intermolekulares Epitop Spreading zwischen den Peptiden der Proteine IRBP und S-Ag nachgewiesen werden.

Auch die Ergebnisse der anderen acht Pferde aus diesem Langzeitversuch lassen die Vermutung zu, dass der rezidivierende Charakter der ERU auf den Mechanismus des Epitop Spreading zurückzuführen ist. Dass lediglich 2 der 10 ERU-Pferde auf cRALBP reagierten, kann damit erklärt werden, dass cRALBP erst in den letzten beiden Untersuchungen eingesetzt werden konnte, da es nicht früher zur Verfügung stand. Damit konnte die Reaktion auf cRALBP nur über 4 Monate beobachtet werden. Weitere Untersuchungen zum Epitop Spreading können eine Beteiligung von cRALBP an diesem Mechanismus vielleicht noch deutlicher zeigen.

Im EAE-Modell konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung neuer Autoantigene einer festgelegten Kaskade mit strenger Hierarchie folgt (Tuohy et al. 1998). Dabei konnte auch beobachtet werden, dass sich die Immunreaktion von einem

Epitop eines Proteins auf ein anderes Protein verlagerte, um sich danach auf ein anderes Epitop des ersten Proteins zurückzuverlagern (Yu et al. 1996). Diese Erkenntnis führte zu der Hypothese, dass es möglich sein muss, durch gezielte Toleranzinduktion auf bestimmte Peptide die Kaskade an bestimmten Stellen zu unterbrechen und somit zu stoppen (Yu et al. 1996).

Auch in der Multiplen Sklerose des Menschen konnte Epitop Spreading dargestellt werden, allerdings folgt die Rekrutierung neuer Autoantigene keiner strengen Hierarchie, wie sie in den Mausmodellen erarbeitet wurde. Daher ist es bis jetzt nicht möglich, den progressiven Verlauf der Multiplen Sklerose durch Toleranzinduktion zu stoppen (Goebels et al. 2000).

Auch bei der equinen rezidivierenden Uveitis gibt es bis jetzt keine Hinweise darauf, dass die Rekrutierung der neuen Autoantigene einer gleichförmigen Hierarchie folgt. Somit scheint es schwierig zu sein, durch immunmodulatorische Therapien wie einer oralen Toleranzinduktion, in das fortschreitende Krankheitsgeschehen eingreifen zu können, da das nächste Epitop nicht vorhersagbar ist. Durch weitere Untersuchungen zur T-Zellantwort von ERU-Patienten können darüber jedoch noch genauere Aussagen getroffen werden. Hierzu sollte auch versucht werden, cRALBP in Peptide zu zerlegen, um die T-Zellantwort auf diese einzelnen Peptide zu testen.

Mit diesen Ergebnissen kann auf alle Fälle eindeutig belegt werden, dass das zweite Postulat von Witebsky erfüllt ist, nämlich dass eine zelluläre Immunantwort und/oder Antikörper gegen das körpereigene Antigen vorliegen.

Um das potenzielle Autoantigen cRALBP komplett zu charakterisieren, muss eine Immunisierung mit dem Antigen die Erkrankung auslösen (Witebsky 1957). Für diesen Abschnitt wurden zwei verschiedene Tiermodelle gewählt. Als erstes wurden Lewisratten mit dem Protein immunisiert. Das Lewisrattenmodell stellt in der EAU-Forschung ein etabliertes Tiermodell dar (Caspi 1993) und war deswegen Ziel unserer ersten Immunisierungen. Nachdem für die Autoantigene IRBP und S-Ag in der equinen rezidivierenden Uveitis ein neues Tiermodell, nämlich die *horse experimental uveitis (HEU)*, etabliert werden konnte (Deeg et al. 2004; Deeg et al. 2002b), sollte das zu charakterisierende cRALBP auch in diesem Modell überprüft werden. Neben diesem Argument ist es aber auch von

enormem Vorteil, die Erkrankung in derselben Spezies zu untersuchen, in der die Erkrankung auftritt. Die veterinärmedizinische Forschung hat somit einen entschiedenen Vorteil gegenüber der humanmedizinischen Forschung. In der Humanmedizin muss, aus nahe liegenden Gründen, bei der Erforschung von Krankheiten auf Tiermodelle zurückgegriffen werden. Die Übertragbarkeit aus den Tiermodellen auf den Menschen unterliegt dabei häufig Enttäuschungen (Hein & Griebel 2003).

Um nun also dieses dritte Postulat zu erfüllen, wurden Lewisratten bzw. Pferde, wie unter 3.1.2 (Pferde) und 3.1.4 (Ratten) beschrieben, immunisiert. Bei den Pferden wurde zusätzlich zu dem pathohistologischen Score nach Caspi (Caspi et al. 1993) ein klinischer Score nach dem von Gerhards und Thureau beschriebenen Schema (Deeg et al. 2004) errechnet.

Bei den Lewisratten erkrankten 8 von 9 Ratten an einer Uveitis. Die pathohistologischen Ergebnisse der Versuche an Ratten zeigten im Einzelnen gravierende Strukturveränderungen in der Retina. Die stärksten Veränderungen konnten dabei in den Ratten aus dem dritten Experiment gezeigt werden. Ratte 1 aus diesem Experiment zeigte eine hochgradige Entzündung und Zerstörung der retinalen Architektur in mehr als  $\frac{1}{4}$  der Retina, die Ratten 2 und 3 kleine bis großflächige exsudative Netzhautablösungen, die auf eine hintere Uveitis hindeuten. Diese Ergebnisse zeigen die Uveitogenität von cRALBP in der Lewisratte. Die Inzidenz beträgt  $\frac{8}{9}$  mit einem deutlichen Score. Bisher wurde noch nicht versucht, diese Uveitis zu reinduzieren.

Im Pferdmodell erkrankten 3 von 3 mit cRALBP immunisierten Pferden an einer Uveitis. Im Unterschied zu den klinischen Ergebnissen aus der Immunisierung mit IRBP (Deeg et al. 2002b) zeigten diese Pferde nur einen sehr schwachen klinischen Score. Erklärt werden kann dieser geringe klinische Score mit den Befunden aus der Pathohistologie, die eine deutlich hintere Uveitis zeigen. Diese Form der Uveitis tritt klinisch nur sehr gering in Erscheinung, da die unter der Retina gelegene Chorioidea nicht sensibel innerviert ist und eine hintere Uveitis somit schmerzfrei verläuft (Gerhards & Wollanke 2001). Jedoch konnten trotz der Schmerzfreiheit Anzeichen einer Entzündung festgestellt werden (gelblicher Fundusreflex, Glaskörpertrübung). Dieses klinische Bild war reinduzierbar.

Trotz der geringen klinischen „Augenscheinlichkeit“ dieser durch cRALBP induzierten Uveitis zeigte sich ein klares pathohistologisches Bild. Alle drei Pferde

hatten eine Uveitis entwickelt. Das Tier, das mit denaturiertem cRALBP immunisiert wurde, zeigte die geringsten pathohistologischen Veränderungen. Die Faltung von cRALBP scheint bei der Pathogenität eine Rolle zu spielen. Die Veränderungen zeigten sich im Sinne einer retinalen Vaskulitis und der Zerstörung der Zellen, die cRALBP exprimieren, die Zellen der Photorezeptorenschicht und die Müllerzellen.

Beide Pferde, die mit nativem cRALBP immunisiert worden waren, wiesen hochgradige strukturelle Veränderungen in mehr als  $\frac{1}{4}$  der Retina auf. Die Immunhistologie konnte in einer speziellen Doppelfärbung der Müllerzellen mit Glutaminsynthetase-fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP) und Glutaminsynthetase (GS) zeigen, dass die Müllerzellen von der Entzündung betroffen sind und verschwinden. Ein Nachweis dieser retinalen Stützzellen war in stark veränderten Bereichen der Retina nicht mehr möglich. Diese pathohistologischen Befunde sollten in spontan erkrankten ERU-Pferden weiter untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt, der untersucht werden sollte, sind die 11,6 % cRALBP-positiv getesteten gesunden Pferde. Diese Pferde sollten weiterhin kontrolliert und beobachtet werden. Zahlreiche Autoantigene sind im Zusammenhang mit dem T-Zell-vermittelten (Typ-I) Diabetes des Menschen identifiziert worden. Die Untersuchung der Autoantikörperbildung wird heute prädiktiv genutzt. Dazu werden die Antikörpertiter gegen die Autoantigene GAD (glutamic acid decarboxylase), IA-2 (tyrosine phosphatase-like molecule) und Insulin bestimmt. Reagiert die getestete Person auf alle drei Autoantigene, so besteht ein Risiko von 62-100% in den nächsten 5-10 Jahren an einem Typ-I-Diabetes zu erkranken. Dagegen liegt das Risiko bei 0-1% für Personen, die nur auf ein Autoantigen reagieren (Barker et al. 2004, Kimpimaki et al. 2001, Vandewalle et al. 1995). Dieser prädiktive Charakter von Autoantikörpern könnte auch auf die equine rezidivierende Uveitis zutreffen, weshalb die Gruppe mit den 11,6% cRALBP-positiv getesteten Pferden in der Kontrollgruppe weiterhin unter Beobachtung bleiben sollte.

Es konnte also sowohl im Lewisrattenmodell als auch im Pferdmodell eindeutig gezeigt werden, dass die Immunisierung der Tiere mit cRALBP eine Uveitis auslöst.

Somit sind alle drei geforderten Postulate von Witebsky erfüllt und cRALBP ist als neues Autoantigen in der equinen rezidivierenden Uveitis charakterisiert.





## 6 Zusammenfassung

Als eine der wichtigsten Augenerkrankungen des Pferdes wird der equinen rezidivierenden Uveitis seit der Antike eine große Bedeutung beigemessen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung jedoch nicht ganz erforscht. Viele vorausgegangene Untersuchungen weisen auf ein autoimmun-mediertes Geschehen hin.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des potenziellen Autoantigens cellular retinaldehyde-binding protein (cRALBP) anhand der Kriterien der drei Postulate von Witebsky.

Dem ersten Postulat folgend muss das Autoantigen bekannt sein. cRALBP wurde bereits in einer früheren Arbeit als potenzielles Autoantigen in der ERU beschrieben (Pompetzki 2003).

Dem zweiten Postulat Witebskys folgend, müssen Autoantikörper und/oder autoreaktive Zellen gegen das potentielle Autoantigen nachgewiesen werden. Dazu wurden die Serumproben von 289 und die Glaskörperspülproben von 326 ERU-Patienten im ELISA getestet. 29,1% der Serumproben und 19% der Glaskörperproben wiesen positive ODs gegen cRALBP auf. Die Untersuchungen zur T-Zellantwort zeigten, dass 6 von 20 ERU-Patienten nach Kontakt mit cRALBP in den Proliferationsassays positive Stimulationsindizes aufzeigen. Das gleichzeitige Auftreten positiver ODs gegen cRALBP und andere, bereits bekannte retinale Autoantigene im ELISA lässt auf eine Beteiligung von cRALBP am Mechanismus des Epitop Spreading schließen. Auch in der T-Zellantwort konnte dies nachgewiesen werden.

Die Induktion der Erkrankung durch Immunisierung gilt als indirekter Beweis einer autoimmun-medierten Erkrankung und beschreibt das dritte Postulat von Witebsky. Sowohl im Lewisratten- als auch im Pferdmodell konnte durch subcutane Immunisierung mit cRALBP in FCA eine Uveitis ausgelöst werden. Diese konnte sowohl klinisch als auch histopathologisch gezeigt werden.

Somit wurden alle zur Charakterisierung eines potenziellen Autoantigens notwendigen Postulate von Witebsky erfüllt und cRALBP muss, neben S-Antigen und Interphotorezeptor-Retinoid-bindendem-Protein, als neues Autoantigen in der ERU bezeichnet werden.

## 7 Summary

### Characterisation of the potential autoantigen cRALBP

Equine recurrent uveitis, being one of the most important equine eye diseases, has attracted significant attention ever since antiquity. The aetiology and pathogenesis of this disorder have not yet been completely ascertained. Much of the previous research, however, indicates the presence of auto-immune mechanisms. The aim of the present research was to characterise the potential antigen cellular retinaldehyde-binding protein (cRALBP) using the criteria of the three postulates put forward by Witebsky.

According to Witebsky's first postulate, the autoantigen has to be known. cRALBP was described as a potential autoantigen in the ERU in a previous study (Pompetzki 2003).

According to Witebsky's second postulate, autoantibodies and/or cells which are autoreactive to the potential autoantigen must be able to be detected. In order to demonstrate this, 289 serum samples and 326 vitreous samples were examined by ELISA. 29.1% of the serum and 19% of the vitreous samples were positive for cRALBP. Examination of the t-cell-response in proliferation assays showed that 6 out of the 20 ERU patients examined displayed positive stimulation indices after contact with cRALBP. Simultaneous occurrence in ELISA assays of positive cRALBP ODs and other retinal antigens already known indicate that cRALBP plays a role in the mechanism of Epitop spreading. The t-cell response reaffirmed this.

Induction of the disease by immunisation in combination with the two preceding examinations serves as indirect proof that a disease based on autoimmune mechanisms is present and corresponds to Witebsky's third postulate. It was found that uveitis could be induced in trials both with Lewis rats and with horses by subcutaneous injection of cRALBP in CFA. The condition was ascertained both clinically and histopathologically.

Consequently, all the postulates put forward by Witebsky as necessary for the characterization of a potential antigen were fulfilled and cRALBP has to be described as a new antigen in ERU in addition to S-antigen and interphotoreceptor-retinoid-binding-protein.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adamus, G., Ortega, H., Witkowska, D. & Polans, A. 1994: Recoverin: a potent uveitogen for the induction of photoreceptor degeneration in Lewis rats. *Exp Eye Res* **59**, 447-55.
- Albert, L. J. & Inman, R. D. 1999: Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* **341**, 2068-74.
- Alexander, C. S. & Keller, H. 1990: [Etiology and occurrence of periodic eye inflammation of horses in the area of Berlin]. *Tierarztl Prax* **18**, 623-7.
- Attenburrow, D. P., Donnelly, J.J. & Soulsby, E. J. L. 1983: Periodic ophthalmia (recurrent uveitis) of horses: An evaluation of the aetiological role of microfilariae of *onchocerca cervicalis* and the clinical management of the condition. *Equine Vet J* **3**, 48-56.
- Barker, J. M., Barriga, K. J., Yu, L., Miao, D., Erlich, H. A., Norris, J. M., Eisenbarth, G. S., Rewers, M. 2004: Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3896-902.
- Bayes, M., Martinez-Mir, A., Valverde, D., del Rio, E., Vilageliu, L., Grinberg, D., Balcells, S., Ayuso, C., Baiget, M. & Gonzalez-Duarte, R. 1996: Autosomal recessive retinitis pigmentosa in Spain: evaluation of four genes and two loci involved in the disease. *Clin Genet* **50**, 380-7.
- Bernal, S., Calaf, M., Adan, A., Solans, T., Valverde, D., Ayuso, C. & Baiget, M. 2001: Evaluation of RLBP1 in 50 autosomal recessive retinitis pigmentosa and 4 retinitis punctata albescens Spanish families. *Ophthalmic Genet* **22**, 19-25.
- Boughman, J. A., Conneally, P. M. & Nance, W. E. 1980: Population genetic studies of retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* **32**, 223-35.
- Bunt-Milam, A. H. & Saari, J. C. 1983: Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J Cell Biol* **97**, 703-12.
- Burstedt, M. S., Forsman-Semb, K., Golovleva, I., Janunger, T., Wachtmeister, L. & Sandgren, O. 2001: Ocular phenotype of bothnia dystrophy, an autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with an R234W mutation in the RLBP1 gene. *Arch Ophthalmol* **119**, 260-7.
- Burstedt, M. S., Sandgren, O., Golovleva, I. & Wachtmeister, L. 2003: Retinal function in Bothnia dystrophy. An electrophysiological study. *Vision Res* **43**, 2559-71.
- Burstedt, M. S., Sandgren, O., Holmgren, G. & Forsman-Semb, K. 1999: Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 995-1000.

- Buzdygon, B., Philp, N., Zigler, J. S., Gery, I. & Zuckerman, R. 1985: Identity of S-antigen and the 48 kilodalton protein in retinal rod outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**, 293.
- Caspi, R. R., Chan, C. C., Fujino, Y., Najafian, F., Grover, S., Hansen, C. T. & Wilder, R. L. 1993: Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis. *J Neuroimmunol* **47**, 177-88.
- Caspi, R. R., Roberge, F. G., Chan, C. C., Wiggert, B., Chader, G. J., Rozenszajn, L. A., Lando, Z. & Nussenblatt, R. 1988: Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* **140**, 1490-1495.
- Caspi, R. R., Roberge, F. G., McAllister, C. G., el-Saied, M., Kuwabara, T., Gery, I., Hanna, E. & Nussenblatt, R. B. 1986: T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol* **136**, 928-33.
- Chader, G. J. 1989: Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): a model protein for molecular biological and clinically relevant studies. Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**, 7-22.
- Chader, G. J. & Wiggert, B. 1984: Interphotoreceptor retinoid-binding protein. Characteristics in bovine and monkey retina. *Vision Res* **24**, 1605-14.
- Chan, C. C., Caspi, R. R., Ni, M., Leake, W. C., Wiggert, B., Chader, G. J. & Nussenblatt, R. B. 1990: Pathology of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Autoimmun* **3**, 247-55.
- Chan, C. C., Caspi, R. R., Roberge, F. G. & Nussenblatt, R. B. 1988: Dynamics of experimental autoimmune uveoretinitis induced by adoptive transfer of S-antigen-specific T cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**, 411-8.
- Chan, C. C., Detrick, B., Nussenblatt, R. B., Palestine, A. G., Fujikawa, L. S. & Hooks, J. J. 1986a: HLA-DR antigens on retinal pigment epithelial cells from patients with uveitis. *Arch Ophthalmol* **104**, 725-9.
- Chan, C. C., Hooks, J. J., Nussenblatt, R. B. & Detrick, B. 1986b: Expression of Ia antigen on retinal pigment epithelium in experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res* **5**, 325-30.
- Cooley, P. L., Wyman, M. & Kindig, O. 1990: Pars plicata in equine recurrent uveitis. *Vet Pathol* **27**, 138-40.
- Crabb, J. W., Carlson, A., Chen, Y., Goldflam, S., Intres, R., West, K. A., Hulmes, J. D., Kapron, J. T., Luck, L. A., Horwitz, J. & Bok, D. 1998: Structural and functional characterization of recombinant human cellular retinaldehyde-binding protein. *Protein Sci* **7**, 746-57.

- Crabb, J. W., Goldflam, S., Harris, S. E. & Saari, J. C. 1988: Cloning of the cDNAs encoding the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine and human retina and comparison of the protein structures. *J Biol Chem* **263**, 18688-92.
- Cross, A. H., Tuohy, V. K. & Raine, C. S. 1993: Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination. *Cell Immunol* **146**, 261-9.
- Davidson, M. G., Nasisse, M. P. & Roberts, S. M. 1987: Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses. *Equine Vet J* **19**, 155-7.
- de Smet, M. D., Bitar, G., Mainigi, S. & Nussenblatt, R. B. 2001: Human S-antigen determinant recognition in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 3233-8.
- de Smet, M. D., Bitar, G., Roberge, F. G., Gery, I. & Nussenblatt, R. B. 1993: Human S-antigen: presence of multiple immunogenic and immunopathogenic sites in the Lewis rat. *J Autoimmun* **6**, 587-99.
- de Smet, M. D., Yamamoto, J. H. & Mochizuki, M. 1990: Cellular immune response of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments. *Am J Ophthalmol* **110**, 135-142.
- Deeg, C. A., Ehrenhofer, M., Thurau, S. R., Reese, S., Wildner, G. & Kaspers, B. 2002a: Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* **75**, 127-33.
- Deeg, C. A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thurau, S. R., Wollanke, B. & Wildner, G. 2001: Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 393-8.
- Deeg, C. A., Reese, S., Gerhards, H., Wildner, G. & Kaspers, B. 2004: The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2286-92.
- Deeg, C. A., Thurau, S. R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G. & Kaspers, B. 2002b: Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* **32**, 2598-606.
- Detrick, B., Rodrigues, M., Chan, C. C., Tso, M. O. & Hooks, J. J. 1986: Expression of HLA-DR antigen on retinal pigment epithelial cells in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* **101**, 584-90.
- Doekes, G., van der Gaag, R., Rothova, A., van Kooyk, Y., Broersma, L., Zaal, M. J., Dijkman, G., Fortuin, M. E., Baarsma, G. S. & Kijlstra, A. 1987: Humoral and cellular immune responsiveness to human S-antigen in uveitis. *Curr Eye Res* **6**, 909-19.
- Donoso, L. A., Merryman, C. F., Shinohara, T., Dietzschold, B., Wistow, G., Craft, C., Morley, W. & Henry, R. T. 1986: S-antigen: identification of the MAbA9-C6 monoclonal antibody binding site and the uveitopathogenic sites. *Curr Eye Res* **5**, 995-1004.

- Dowling, J. E. 1960: Chemistry of visual adaptation in the rat. *Nature* **188**, 114-8.
- Dua, H. S., Lee, R. H., Lolley, R. N., Barrett, J. A., Abrams, M., Forrester, J. V. & Donoso, L. A. 1992: Induction of experimental autoimmune uveitis by the retinal photoreceptor cell protein, phosducin. *Curr Eye Res* **11 Suppl**, 107-11.
- Dubielzig, R. R., Render, J. A. & Morreale, R. J. 1997: Distinctive morphologic features of the ciliary body in equine recurrent uveitis. *Vet Comp Ophthalmol* **7**, 163-167.
- Dwyer, A. E., Crockett, R. S. & Kalsow, C. M. 1995: Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993). *J Am Vet Med Assoc* **207**, 1327-31.
- Ehrenhofer, M. C., Deeg, C. A., Reese, S., Liebich, H. G., Stangassinger, M. & Kaspers, B. 2002: Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol* **5**, 39-47.
- Eichers, E., Green, J., Stockton, D., Jackman, C., Whelan, J., McNamara, J., Johnson, G., Lupski, J. & Katsanis, N. 2002: Newfoundland rod-cone dystrophy, an early-onset retinal dystrophy, is caused by splice-junction mutations in RLBP1. *Am J Hum Genet* **70**, 955-964.
- Eisenfeld, A. J., Bunt-Milam, A. H. & Saari, J. C. 1987: Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Exp Eye Res* **44**, 425-38.
- Faure, J. P., de Kozak, Y., Dorey, C. & Tuyen, V. V. 1977: [Activity of different antigenic preparations from the retina to induce experimental auto-immune uveo-retinitis (EAU) in guinea pigs (author's transl)]. *Arch Ophthalmol (Paris)* **37**, 47-60.
- Fujikawa, L. S. & Haugen, J. P. 1990: Immunopathology of vitreous and retinochoroidal biopsy in posterior uveitis. *Ophthalmology* **97**, 1644-53.
- Futterman, S., Saari, J. C. & Blair, S. 1977: Occurrence of a binding protein for 11-cis-retinal in retina. *J Biol Chem* **252**, 3267-71.
- Gerhards, H. & Wollanke, B. 2001: Uveitis bei Pferden-Diagnose und Therapie. *Pferdeheilkunde* **4**, 319-329.
- Gery, I., Chanaud, N. P., 3rd & Anglade, E. 1994: Recoverin is highly uveitogenic in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**, 3342-5.
- Gery, I., Mochizuki, M. & Nussenblatt, R. 1986a: Retinal specific antigen and immunopathogenetic process they provoke. *Prog Ret Res* **5**, 75-109.
- Gery, I., Wiggert, B., Redmond, T. M., Kuwabara, T., Crawford, M. A., Vistica, B. P. & Chader, G. J. 1986b: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with

- interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**, 1296-300.
- Gharavi, A. E., Chu, J. L. & Elkon, K. B. 1988: Autoantibodies to intracellular proteins in human systemic lupus erythematosus are not due to random polyclonal B cell activation. *Arthritis Rheum* **31**, 1337-45
- Gilger, B. C., Malok, E., Cutter, K. V., Stewart, T., Horohov, D. W. & Allen, J. B. 1999: Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* **71**, 17-28.
- Goebels, N., Hofstetter, H., Schmidt, S., Brunner, C., Wekerle, H. & Hohlfeld, R. 2000: Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: Epitope spreading versus clonal persistence. *Brain* **123 Pt 3**, 508-18.
- Golovleva, I., Bhattacharya, S., Wu, Z., Shaw, N., Yang, Y., Andrabi, K., West, K. A., Burstedt, M. S., Forsman, K., Holmgren, G., Sandgren, O., Noy, N., Qin, J. & Crabb, J. W. 2003: Disease-causing mutations in the cellular retinaldehyde binding protein tighten and abolish ligand interactions. *J Biol Chem* **278**, 12397-402.
- Granse, L., Abrahamson, M., Ponjavic, V. & Andreasson, S. 2001: Electrophysiological findings in two young patients with Bothnia dystrophy and a mutation in the RLBP1 gene. *Ophthalmic Genet* **22**, 97-105.
- Gregerson, D. S., Fling, S. P., Obritsch, W. F., Merryman, C. F. & Donoso, L. A. 1989: Identification of T cell recognition sites in S-antigen: dissociation of proliferative and pathogenic sites. *Cell Immunol* **123**, 427-40.
- Gregerson, D. S., Obritsch, W. F. & Fling, S. P. 1987: Identification of a uveitogenic cyanogen bromide peptide of bovine retinal S-antigen and preparation of a uveitogenic, peptide-specific T cell line. *Eur J Immunol* **17**, 405-11.
- Hathaway, S. C., Little, T. W., Finch, S. M. & Stevens, A. E. 1981: Leptospirosis infection in horses in England: a serological study. *Vet Rec* **108**, 396-8.
- Hauck, S. M., Suppmann, S. & Ueffing, M. 2003: Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. *Glia* **44**, 251-63.
- Hecklenlively, J. R. & Ewan, H. 1988: Retinitis pigmentosa.
- Hein, W. R. & Griebel, P. J. 2003: A road less travelled: large animal models in immunological research. *Nat Rev Immunol* **3**, 79-84.
- Heusser, H. 1948: Die periodische Augenentzündung, eine Leptospirose. *Schweiz Arch Tierheilk* **90**, 287-312.
- Hines, M. T. 1984: Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* **6**, 501-12.

- Hines, M. T. & Halliwell, R. E. W. 1991: Autoimmunity to retinal S-antigen in horses with equine recurrent uveitis. *Prog Vet Comp Ophthalmol* **1**, 283-290.
- Hines, M. T., Jarpe, A. & Halliwell, R. E. W. 1990: Equine recurrent uveitis: Immunization of ponies with equine retinal S-antigen. *Prog Vet Comp Ophthalmol* **2**, 3-11.
- Hirose, S., Kuwabara, T., Nussenblatt, R. B., Wiggert, B., Redmond, T. M. & Gery, I. 1986: Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol* **104**, 1698-702.
- Hirose, S., Singh, V. K., Donoso, L. A., Shinohara, T., Kotake, S., Tanaka, T., Kuwabara, T., Yamaki, K., Gery, I. & Nussenblatt, R. B. 1989: An 18-mer peptide derived from the retinal S antigen induces uveitis and pinealitis in primates. *Clin Exp Immunol* **77**, 106-11.
- Hoppu, S., Ronkainen, M. S., Kulmala, P., Akerblom, H. K. & Knip, M. 2004: GAD65 antibody isotypes and Epitop recognition during the prediabetic process in siblings of children with type I diabetes. *Clin Exp Immunol* **136**, 120-8.
- Intres, R., Goldflam, S., Cook, J. R. & Crabb, J. W. 1994: Molecular cloning and structural analysis of the human gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem* **269**, 25411-8.
- Kalsow, C. M., Dubielzig, R. R. & Dwyer, A. E. 1999: Immunopathology of pineal glands from horses with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1611-5.
- Kalsow, C. M., Dwyer, A. E., Smith, A. W. & Nifong, T. P. 1992: Pinealitis coincident with recurrent uveitis: immunohistochemical studies. *Curr Eye Res* **11 Suppl**, 147-51.
- Kalsow, C. M. & Wacker, W. B. 1977: Pineal reactivity of anti-retina sera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **16**, 181-4.
- Kalsow, C. M. & Wacker, W. B. 1978: Pineal gland involvement in retina-induced experimental allergic uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**, 774-83.
- Kalsow, C. M., Zhavoronkova, M. D. & Dwyer, A. E. 1995: Response of nonpigmented ciliary epithelium in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 540.
- Katsanis, N., Shroyer, N. F., Lewis, R. A., Cavender, J. C., Al-Rajhi, A. A., Jabak, M. & Lupski, J. R. 2001: Fundus albipunctatus and retinitis punctata albescens in a pedigree with an R150Q mutation in RLBP1. *Clin Genet* **59**, 424-9.
- Kentroti, S., Baker, R., Lee, K., Bruce, C. & Vernadakis, A. 1991: Platelet-activating factor increases glutamine synthetase activity in early and late passage C-6 glioma cells. *J Neurosci Res* **28**, 497-506.

- Kim, M. K., Chan, C. C., Belfort, R., Farah, M., Burnier, M. P., Nussenblatt, R. B., Kuwabara, T. & Palestine, A. G. 1987: Histopathologic and immunohistopathologic features of subretinal fibrosis and uveitis syndrome. *Am J Ophthalmol* **104**, 15-23.
- Kimpimaki, T., Kupila, A., Hamalainen, A. M., Kukko, M., Kulmala, P., Savola, K., Simell, T., Keskinen, P., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M. 2001: The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4782-8.
- Klose, J. 1975: Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-43.
- Kotake, S., de Smet, M. D., Wiggert, B., Redmond, T. M., Chader, G. J. & Gery, I. 1991: Analysis of the pivotal residues of the immunodominant and highly uveitogenic determinant of interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J Immunol* **146**, 2995-3001.
- Kuhn, H. 1984: Interactions between photoexcited rhodopsin and light-activated enzymes in rods. *Prog Ret Res* **3**, 124-156.
- Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A. & Sercarz, E. E. 1992: Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* **358**, 155-7.
- Liversidge, J. & Forrester, J. V. 1988: Experimental autoimmune uveitis (EAU): immunophenotypic analysis of inflammatory cells in chorio retinal lesions. *Curr Eye Res* **7**, 1231-41.
- Mair, T. S. & Crispin, S. M. 1989: Immunological mechanisms in uveitis. *Equine Vet J* **21**, 391-3.
- Marak, G. E. J., Shichi, H., A., R. N. & Wacker, W. B. 1980: Patterns of experimental allergic uveitis induced by rhodopsin and retinal rod outer segments. *Ophthalmic Res* **12**, 165-176.
- Mata, N. L., Radu, R. A., Clemmons, R. C. & Travis, G. H. 2002: Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* **36**, 69-80.
- Matthews, A. G., Waitkins, S. A. & Palmer, M. F. 1987: Serological study of leptospiral infections and endogenous uveitis among horses and ponies in the United Kingdom. *Equine Vet J* **19**, 125-8.
- Maw, M. A., Kennedy, B., Knight, A., Bridges, R., Roth, K. E., Mani, E. J., Mukkadan, J. K., Nancarrow, D., Crabb, J. W. & Denton, M. J. 1997: Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* **17**, 198-200.

- Maxwell, S. A., Hurt, D., A.H., B. & Takemoto, D. 1991: Humoral responses to retinal proteins in horses with recurrent uveitis. *Vet Comp Ophthalmol* **1**, 155-162.
- McCarron, R. M., Fallis, R. J. & McFarlin, D. E. 1990: Alterations in T cell antigen specificity and class II restriction during the course of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **29**, 73-9.
- McRae, B. L., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C. & Miller, S. D. 1995: Functional evidence for Epitop spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **182**, 75-85.
- Miller, S. D., Vanderlugt, C. L., Lenschow, D. J., Pope, J. G., Karandikar, N. J., Dal Canto, M. C. & Bluestone, J. A. 1995: Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents Epitop spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* **3**, 739-45.
- Mochizuki, M., Kuwabara, T., McAllister, C., Nussenblatt, R. B. & Gery, I. 1985: Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**, 1-9.
- Morimura, H., Berson, E. L. & Dryja, T. P. 1999: Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1000-4.
- Nussenblatt, R. B. 1991: Proctor Lecture. Experimental autoimmune uveitis: mechanisms of disease and clinical therapeutic indications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**, 3131-41.
- Oldstone, M. B. 1987: Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* **50**, 819-20.
- Ott, P. A., Dittrich, M. T., Herzog, B. A., Guerkov, R., Gottlieb, P. A., Putnam, A. L., Durinovic-Bello, I., Boehm, B. O., Tary-Lehmann, M. & Lehmann, P. V. 2004: T cells recognize multiple GAD65 and proinsulin Epitops in human type 1 diabetes, suggesting determinant spreading. *J Clin Immunol* **24**, 327-39.
- Perry, L. L., Barzaga-Gilbert, E. & Trotter, J. L. 1991: T cell sensitization to proteolipid protein in myelin basic protein-induced relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **33**, 7-15.
- Polans, A. S., Burton, M. D., Haley, T. L., Crabb, J. W. & Palczewski, K. 1993: Recoverin, but not visinin, is an autoantigen in the human retina identified with a cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 81-90.
- Pompetzki, D. 2003: Investigation of the humoral immune response in horses with equine recurrent uveitis for the recognition of retinal autoantigens. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Prinz, J. C. 2004: Disease mimicry-a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry? *Autoimmun Rev* **3**, 10-5.
- Rebhun, W. C. 1999: Immune-Mediated Uveitis. *Equine Medicine and Surgery*, 1255-58.
- Redmond, T. M., Wiggert, B., Robey, F. A., Nguyen, N. Y., Lewis, M. S., Lee, L. & Chader, G. J. 1985: Isolation and characterization of monkey interphotoreceptor retinoid-binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina. *Biochemistry* **24**, 787-93.
- Ren, J., Bonderenko, V. A., Yamazaki, A. & Shichi, H. 1996: Experimental autoimmune uveoretinitis induced by the gamma-subunit of cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 2527-31.
- Rimpau, W. 1947: Leptospirose beim Pferd (Periodische Augenentzündung). *Tierärztl Umschau* **2**, 177-178.
- Roitt, I. 2000: Autoimmune Disease. *Essential Immunology*, 411-417.
- Romeike, A., Brugmann, M. & Drommer, W. 1998: Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol* **35**, 515-26.
- Rose, N. R., Bona C. 1993: Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* **14**, 426-30.
- Saari, J. C., Bredberg, D. L. & Noy, N. 1994: Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *Biochemistry* **33**, 3106-12.
- Saari, J. C., Bredberg, L. & Garwin, G. G. 1982: Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* **257**, 13329-33.
- Saari, J. C., Huang, J., Possin, D. E., Fariss, R. N., Leonard, J., Garwin, G. G., Crabb, J. W. & Milam, A. H. 1997: Cellular retinaldehyde-binding protein is expressed by oligodendrocytes in optic nerve and brain. *Glia* **21**, 259-68.
- Saari, J. C., Nawrot, M., Kennedy, B. N., Garwin, G. G., Hurley, J. B., Huang, J., Possin, D. E. & Crabb, J. W. 2001: Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron* **29**, 739-48.
- Sanui, H., Redmond, T. M., Hu, L. H., Kuwabara, T., Margalit, H., Cornette, J. L., Wiggert, B., Chader, G. J. & Gery, I. 1988: Synthetic peptides derived from IRBP induce EAU and EAP in Lewis rats. *Curr Eye Res* **7**, 727-35.
- Sato, M., Oshika, T., Kaji, Y. & Nose, H. 2004: A novel homozygous Gly107Arg mutation in the RDH5 gene in a Japanese patient with fundus albipunctatus with sectorial retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res* **36**, 43-50.

- Shinohara, T., Donoso, L., Wistow, G., Dietzschold, B., Craft, C. & Tao, R. 1987: The structure of bovine retinal S-antigen: sequence analysis and identification of monoclonal antibody Epitops and uveitogenic site. *Jpn J Ophthalmol* **31**, 197-206.
- Sillerud, C. L., Bey, R. F., Ball, M. & Bistner, S. I. 1987: Serologic correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar pomona-induced uveitis in a group of horses. *J Am Vet Med Assoc* **191**, 1576-8.
- Sparkes, R. S., Heinzmann, C., Goldflam, S., Kojis, T., Saari, J. C., Mohandas, T., Klisak, I., Bateman, J. B. & Crabb, J. W. 1992: Assignment of the gene (RLBP1) for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) to human chromosome 15q26 and mouse chromosome 7. *Genomics* **12**, 58-62.
- Spiess, B. M. 1997: Zur equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **139**, 126-133.
- Stecher, H., Gelb, M. H., Saari, J. C. & Palczewski, K. 1999: Preferential release of 11-cis-retinol from retinal pigment epithelial cells in the presence of cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem* **274**, 8577-85.
- Steinbach, F., Deeg, C. A., Mael, S. & Wagner, B. 2002: Equine immunology: offspring of the serum horse. *Trends Immunol* **23**, 223-5.
- Stubbs, G. W., Saari, J. C. & Futterman, S. 1979: 11-cis-Retinal-binding protein from bovine retina. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem* **254**, 8529-33.
- Szemes, P. A. & Gerhards H. 2000: Untersuchung zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn. *Prakt Tierarzt* **81**, 408-20.
- Thurau, S. R. & Wildner, G. 2002: Oral tolerance for treating uveitis - new hope for an old immunological mechanism. *Prog Retin Eye Res* **21**, 577-89.
- Tizard, I. R. 2000: Autoimmunity: General Principles. *Veterinary Immunology. An Introduction*, 362-368.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Tuohy, V. K., Fritz, R. B. & Ben-Nun, A. 1994: Self-determinants in autoimmune demyelinating disease: changes in T- cell response specificity. *Curr Opin Immunol* **6**, 887-91.
- Tuohy, V. K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J. A., Johnson, J. M., Mathisen, P. M., Weinstock-Guttman, B. & Kinkel, R. P. 1998: The Epitop spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* **164**, 93-100.

- Vanderlugt, C. J. & Miller, S. D. 1996: Epitop spreading. *Curr Opin Immunol* **8**, 831-6.
- Vanderlugt, C. L., Neville, K. L., Nikcevich, K. M., Eagar, T. N., Bluestone, J. A. & Miller, S. D. 2000: Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoEpitops in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **164**, 670-8.
- Vandewalle, C. L., Falorni, A., Svanholm, S., Lernmark, A., Pipeleers, D. G. & Gorus, F. K. 1995: High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus with clinical onset between age 20 and 40 years. The Belgian Diabetes Registry. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 846-51.
- Wacker, W. B., Donoso, L. A., Kalsow, C. M., Yankeelov, J. A., Jr. & Organisciak, D. T. 1977: Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* **119**, 1949-58.
- Wacker, W. B. & Lipton, M. M. 1965: Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* **206**, 253-4.
- Wacker, W. B. & Lipton, M. M. 1968a: Experimental allergic uveitis. I. Production in the guinea pig and rabbit by immunization with retina in adjuvant. *J Immunol* **101**, 151-6.
- Wacker, W. B. & Lipton, M. M. 1968b: Experimental allergic uveitis. II. Serologic and hypersensitive responses of the guinea pig following immunization with homologous retina. *J Immunol* **101**, 157-65.
- Wald, G. 1968: Molecular basis of visual excitation. *Science* **162**, 230-9.
- Werry, H. & Gerhards, H. 1992: [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* **20**, 178-86.
- Wetzig, R., Hooks, J. J., Percopo, C. M., Nussenblatt, R., Chan, C. C. & Detrick, B. 1988: Anti-Ia antibody diminishes ocular inflammation in experimental autoimmune uveitis. *Curr Eye Res* **7**, 809-18.
- Wilden, U., Wust, E., Weyand, I. & Kuhn, H. 1986: Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin. *FEBS Lett* **207**, 292-5.
- Wildner, G. & Thurau, S. R. 1997: Database screening for molecular mimicry. *Immunol Today* **18** 252.
- Wildner, G. & Thurau, S. R. 1994: Cross-reactivity between an HLA-B27-derived peptide and a retinal autoantigen peptide: a clue to major histocompatibility complex association with autoimmune disease. *Eur J Immunol* **24**, 2579-85.
- Winston, A. & Rando, R. R. 1998: Regulation of isomerohydrolase activity in the visual cycle. *Biochemistry* **37**, 2044-50.

- Winterberg, A. 1997: Langzeitergebnisse der Pars-plana-Vitrektomie bei der equinen rezidivierenden Uveitis. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Witebsky, E., Rose, N. R., Terplan, K., Paine, J. R. & Egan, R. W. 1957: Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* **164**, 1439-47.
- Wollanke, B., Rohrbach, B. W. & Gerhards, H. 2001: Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis. *J Am Vet Med Assoc* **219**, 795-800.
- Yamamoto, J. H., Minami, M., Inaba, G., Masuda, K. & Mochizuki, M. 1993: Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in patients with Behcet's disease. *Br J Ophthalmol* **77**, 584-9.
- Yu, M., Johnson, J. M. & Tuohy, V. K. 1996: A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* **183**, 1777-88.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Cornelia Deeg für die exzellente fachliche Betreuung meiner Arbeit. Dank Ihrer konstruktiven Kritik, Ihren Anregungen, Ihrer aufbauenden Persönlichkeit und Ihrer permanenten Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren und folglich neue Ideen zu entwickeln, war es erst möglich, diese Arbeit durchzuführen und zu beenden. Lange private Gespräche haben auch meinen „hippologischen Horizont“ erweitert. Auch dafür ein großes „Dankeschön“!

Bei Prof. Dr. Thomas Göbel möchte ich mich für die jederzeit gewährte Hilfe und Unterstützung bei der Herstellung von cRALBP bedanken.

Großer Dank gebührt auch Frau Barbara Amann, die mir stets eine große Hilfe war und zum Gelingen dieser Doktorarbeit beitrug. Vor allem das Zusammenarbeiten mit Ihr im Labor trug wesentlich zum hervorragenden Arbeitsklima in dieser Arbeitsgruppe bei.

Auch meinen Doktorandenkollegen, insbesondere Herrn Frank Altmann und Frau Christina Buse, danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Sven Reese und Frau Silvia Mitterer aus dem Institut für Tieranatomie danke ich recht herzlich für die Hilfe bei der Präparation der Organe der Versuchstiere und für die Einarbeitung in die „feinmotorischen“ Techniken der Histologie.

Frau Hedviga Opitz (Institut für Tierphysiologie) und Herrn Markus Ungerer (Klinik für Pferde) danke ich für die hervorragende Betreuung meiner Versuchstiere.

Herrn Prof. Gerhards und den Tierärzten der Klinik für Pferde der LMU München, insbesondere Frau Dr. Gabriele Niedermaier, Dr. Marc Cronau, Dr. Stefan Gesell und Dr. Richard McMullen, danke ich für die jederzeit gewährte Hilfe bei der Beurteilung der klinisch feststellbaren Veränderungen der Versuchspferde.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mir durch Ihre Unterstützung neben einem sorgenfreien Studium auch noch die anschließende Promotion ermöglicht hat.

Meiner Freundin Karina Heck danke ich ganz herzlich für die moralische und seelische Unterstützung während der letzten Jahre.

Meiner Familie und Karina möchte ich diese Arbeit widmen.

## Lebenslauf

Name: Albert Johann Raith  
Geburtsdatum: 17.05.1978  
Geburtsort: Freising  
Vater: Albert Anton Raith, Landwirt  
Mutter: Margot Walburga Raith, geb. Königer, Hausfrau  
Geschwister: Christoph Albert Raith, Elektroingenieur  
Holger Simon Raith, Bauingenieur

### Schulbildung

1984-1988 Grundschule Wolnzach  
1988-1997 Gabelsberger Gymnasium Mainburg  
Juli 1997 allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

1997-2003 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
August 2003 3. Tierärztliches Staatsexamen  
September 2003 Tierärztliche Approbation  
seit November 2003 Doktorand am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Ludwig-Maximilians-Universität München