

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Cornelia A. Deeg

Proteomische Charakterisierung und Etablierung der equinen retinalen Pigmentepithel Zelllinie eqRPE1

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

von
Christoph Mark Szober
aus
Posen

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Für meine Nicky

1 EINLEITUNG	9
2 LITERATUR	11
2.1 Equine rezidivierende Uveitis	11
2.1.1 Charakterisierung und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis.....	11
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der ERU.....	12
2.1.3 Klinisches Bild und Histopathologie der ERU	13
2.2 Autoimmune Uveitis	15
2.2.1 Autoimmune Uveitis des Menschen	15
2.2.2 Experimentell induzierbare autoimmune Uveitis (EAU)	16
2.2.3 Die ERU als Modell für die autoimmune Uveitis des Menschen	18
2.3 Die Blut-Retina-Schranke (BRS)	20
2.3.1 Das Immunprivileg des Auges	20
2.3.2 Aufbau und Funktion der BRS	22
2.3.3 Zusammenbruch der BRS bei ERU und weiteren Augenerkrankungen.....	23
2.4 Das RPE und dessen Bedeutung in der Retina	26
2.4.1 Lage und Charakterisierung des RPE	27
2.4.2 Lichtabsorption und Schutz der Retina vor Photooxidation durch das RPE.....	28
2.4.3 Phagozytosefunktion des RPE.....	29
2.4.4 Epitheliale Transportfunktionen des RPE	29
2.4.5 Pufferfunktion des RPE.....	31
2.4.6 Sekretorische Eigenschaften des RPE.....	31
2.4.7 Das RPE und der Retinalzyklus	33
2.5 Zellkulturmodelle	34
2.5.1 Primärkultur und Zelllinie.....	34
2.5.2 Zelllinien des RPE.....	35
2.6 Proteomik	37
2.7 Membranproteine	39
3 PUBLIKATION	41
4 DISKUSSION	62
5 ZUSAMMENFASSUNG	86
6 SUMMARY	88
7 LITERATURVERZEICHNIS	90
DANKSAGUNG	105

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
AMD	engl.: Age-related macular degeneration Altersbedingte Makuladegeneration
AQP	Aquaporin
BRB	engl.: Blood-retinal barrier
BRS	Blut-Retina-Schranke
Ca ²⁺	Kalzium
CD	engl.: Cluster of differentiation
cDNA	engl.: complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -1-Propansulfonat
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRALBP	engl.: Cellular retinaldehyde-binding protein Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
CRBP1	engl.: Cellular retinol-binding protein 1 Zelluläres Retinol-bindendes Protein 1
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DIGE	engl.: Differential gel-electrophoresis Differenzielle Gelelektrophorese
DMEM	engl.: Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

DTT	Dithiothreitol
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
ECM	engl.: Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
eqRPE1	Equines RPE 1
ERU	engl.: Equine recurrent uveitis Equine rezidivierende Uveitis
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	engl.: Fetal calf serum
FGF	engl.: Fibroblast growth factor Fibroblasten- Wachstumsfaktor
GLUT	Glukosetransporter
GO	engl.: Gene ontology
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
ICAM-1	engl.: Intercellular adhesion molecule 1 Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN γ	engl.: Interferone gamma Interferon gamma
IGF-1	engl.: Insulin-like growth factor 1 Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IgA	Immunglobulin Klasse A
IgE	Immunglobulin Klasse E
IgG	Immunglobulin Klasse G
IRBP	engl.: Interphotoreceptor retinoid-binding protein Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
Kir	Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
LC	engl.: Liquid chromatography
LFA-1	Engl.: Lymphocyte function –associated antigen 1 Lymphozyten funktions-assoziertes Antigen 1

Abkürzungsverzeichnis

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LRAT	engl.: Lecithin retinol acyltransferase
LTQ	engl.: Linear trap quadrupole
M	Molar
m	Milli (10^{-3})
MCT	engl.: Monocarboxylate transporter Monocarboxylat-Transporter
MDH	engl.: Malate dehydrogenase Malat-Dehydrogenase
MIF	engl.: Macrophage migration inhibitory factor Makrophagen Migrations-inhibitorischer Faktor
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MMP	engl.: Matrix metalloproteinase Matrix-Metalloprotease
mRNA	engl.: messenger RNA
MS	engl.: Mass spectrometry Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
Na ⁺	Natrium
NADPH	Nicotinamid-Dinucleotid-Phosphat
N-CAM	engl.: Neural cell-adhesion molecule Neuronales Zelladhäsionsmolekül
p	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: Phosphate buffered saline
PBS-T	engl.: Phosphate buffered saline + Tween20
PCR	engl.: Polymerase chain reaction Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	engl.: Platelet-derived growth factor
PEDF	engl.: Pigment epithelium-derived factor
POD	Peroxidase

Abkürzungsverzeichnis

PVR	engl.: Proliferative vitreoretinopathy Proliferative Vitreoretinopathie
RDH	engl.: Retinol dehydrogenase Retinol-Dehydrogenase
RNA	engl.: Ribonucleic acid Ribonukleinsäure
RPE	engl.: Retinal pigment epithelium Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
S-Ag	S (engl.: soluble)-Antigen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFB	Sonderforschungsbereich
TGF β	engl.: Transforming growth factor beta Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF α	engl.: Tumor necrosis factor alpha Tumor-Nekrose Faktor alpha
VEGF	engl.: Vascular endothelial growth factor Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIP	engl.: Vasoactive intestinal peptide Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine Augenerkrankung bei Pferden, die mit einer Prävalenz von circa 10% weltweit die häufigste Ursache für den Verlust des Visus bei Pferden darstellt (Gilger and Michau 2004, Deeg 2009). Die Ätiologie dieser entzündlichen Augenerkrankung ist bisher nicht bekannt, jedoch weiß man, dass es sich um ein immun-mediertes Geschehen handelt, das durch die Einwanderung von Entzündungszellen in das Augeninnere gekennzeichnet ist (Gilger et al. 1999, Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2007a). Die für die ERU charakteristischen, spontan wiederkehrenden Entzündungsschübe führen zu sehr schmerzhaften, entzündlichen Veränderungen wichtiger Strukturen des Pferdeauges, wie der Choroidea, der Iris, des Ziliarkörpers und vor allem der Retina (Deeg et al. 2002a). Aufgrund der bisher fehlenden Ätiologie und der noch unvollständig bekannten Pathogenese ist weiterhin intensive Forschung auf dem Gebiet der ERU in der Veterinärmedizin nötig. Die ERU ist jedoch nicht nur veterinärmedizinisch, sondern auch für die Humanmedizin von großer Bedeutung, da sie das einzige spontane Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen darstellt und somit eine Übertragbarkeit vieler Pathogenese-Mechanismen von der ERU auf die Erkrankung des Menschen ermöglicht (Deeg et al. 2008).

Bei der ERU kommt es zum Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke (BRS) (Deeg et al. 2004, Deeg et al. 2007a), die aus einer inneren und äußeren Barriere besteht, wobei die innere BRS vom Endothel retinaler Gefäße und die äußere BRS vom retinalen Pigmentepithel (RPE) gebildet wird (Cunha-Vaz 1976). Die Endothelzellen und die RPE-Zellen werden von interzellulären Verbindungen, sogenannten Tight-Junctions, eng zusammengehalten und bilden eine dichte Barriere (Kaur et al. 2008). Aktivierte Entzündungszellen sind in der Lage diese Barriere bei der ERU zu überwinden (Degroote et al. 2012). Subretinale Ansammlungen von Entzündungszellen, unter denen sich Pigment-enthaltende Makrophagen befanden, deuteten auf deren Übertritt durch das RPE, somit durch die äußere BRS hin (Deeg et al. 2002a, Deeg et al. 2002b). Das RPE spielt im Pferdeauge als Barrierestruktur eine entscheidende Rolle, da Pferde eine weitgehend avaskuläre Retina besitzen (Ehrenhofer et al. 2002, Eberhardt et al. 2011). Um physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge zwischen der äußeren BRS und den

infiltrierenden Entzündungszellen bei der ERU zu verstehen, sowie davon abgeleitete Hypothesen *in vitro* validieren zu können, bedarf es eines Zellkulturmodells dieser funktionellen Barriere des Pferdes. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, eine equine RPE-Zelllinie zu etablieren und die Gemeinsamkeiten, sowie Unterschiede dieser barriere-bildenden Zellen im nativen und kultivierten Zustand zu untersuchen.

2 LITERATUR

2.1 Equine rezidivierende Uveitis

2.1.1 Charakterisierung und Bedeutung der equinen rezidivierenden Uveitis

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) handelt es sich um eine entzündliche Augenerkrankung des Pferdes, welche einen spontanen und wiederkehrenden Charakter aufweist (Gilger et al. 1999, Deeg et al. 2001). Auch bezeichnet als Mondblindheit, Iridozyklitis oder Periodische Augenentzündung (Gilger and Michau 2004), tritt die ERU mit einer hohen Prävalenz von ungefähr 10 % in der Gesamtpferdepopulation auf und ist weltweit der Hauptgrund für den Verlust des Visus bei Pferden (Deeg et al. 2008, Deeg 2009). Obwohl die Ätiologie dieser Augenerkrankung noch nicht geklärt wurde, ist bisher bekannt, dass es sich bei der ERU um eine autoimmune T-Zell-mediierte Erkrankung handelt (Degroote et al. 2012, Zipplies et al. 2012), wofür vor allem die Rekurrenz, die Infiltration mit aktivierten T-Lymphozyten im Augeninneren, sowie die positive Auswirkung einer Therapie mit Kortikosteroiden sprechen (Gilger et al. 1999, Deeg et al. 2001, Gilger and Michau 2004). Während einer Entzündungsphase kommt es zum Übertritt von T-Lymphozyten aus dem Blut in den Glaskörper des betroffenen Pferdeauges, wobei es sich vornehmlich um autoreaktive CD4+ T-Zellen handelt, welche die Blut-Retina-Schranke (BRS) des betroffenen Pferdeauges überwinden und zur Zerstörung von intraokulären Strukturen führen (Deeg et al. 2001, Gilger et al. 2010). Charakteristisch für die ERU ist, dass Phasen der akuten, oft sehr schmerzhaften Entzündung sich mit Phasen der Symptomlosigkeit abwechseln, was die Diagnosestellung der ERU sehr schwierig macht (Gilger and Michau 2004). In der Entzündungsphase prägen unter anderem Photophobie, Miosis, Hornhautödeme, hintere Synechien und Blepharospasmus das klinische Bild der ERU – abhängig vom Schweregrad (Spiess 1997, Gilger and Michau 2004). Histologisch sind in dieser Phase Veränderungen an intraokulären Strukturen zu verzeichnen, bedingt durch die Infiltration mit T-Lymphozyten in die Choroidea, die Iris, den Ziliarkörper und die Retina des betroffenen Pferdeauges (Deeg et al. 2002a). Aufgrund der hohen

Prävalenz, der starken Schmerzen und des damit einhergehenden Leids betroffener Tiere ist es notwendig, dass weitere Forschung auf dem Gebiet der ERU betrieben wird, um die Ätiologie und Pathogenese vollständig zu verstehen und in Zukunft kausal therapieren zu können. Zudem ist die ERU nicht nur veterinärmedizinisch, sondern auch auf dem Gebiet der Humanmedizin von höchstem Interesse, da das Pferd mit der spontan auftretenden ERU das einzige Tiermodell für die ebenfalls spontan auftretende autoimmune Uveitis des Menschen darstellt (Deeg et al. 2008).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der ERU

Obwohl die ERU bereits Anfang des 19. Jahrhunderts von James Wardrop als besondere Entzündung (Engl.: „specific inflammation“) beschrieben wurde (Paglia et al. 2004), bleibt die Ätiologie dieser entzündlichen Augenerkrankung bislang ungeklärt (Swadzba et al. 2012). Die Wissenschaft richtete ihren Blick auf verschiedene infektiöse Erreger, wie Bakterien oder Parasiten (Alexander and Keller 1990, Gilger et al. 2008), jedoch zeichnete sich in den letzten Jahren ab, dass es sich bei der ERU um ein immun-mediertes Geschehen handelt (Deeg et al. 2001, Gilger et al. 2010). Vor allem der wiederkehrende Charakter der Erkrankung, der geringe Erfolg einer Therapie mit Antibiotika und der im Gegenzug erfolgsversprechende Einsatz von Kortikosteroiden sprachen maßgeblich für die ERU als immun-mediertes Geschehen (Deeg et al. 2001). Verschiedene retinale Antigene, wie das S-Antigen (S-Ag) und das Interphotorezeptor Retinoid-bindende Protein (IRBP) wurden bereits bei ERU kranken Pferden als retinale Autoantigene identifiziert (Deeg et al. 2001). Weitere Autoantigene, die in den Folgejahren identifiziert werden konnten, waren zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP) (Deeg et al. 2006b) und die Malat-Dehydrogenase (MDH) (Deeg 2009), wovon CRALBP auch bei der autoimmunen Uveitis des Menschen als Autoantigen bestätigt werden konnte (Deeg et al. 2007b). Gemein haben alle diese Autoantigene, dass sie eine T-Zell-medierte Immunantwort mit Bildung von Autoantikörpern gegen diese entsprechenden Autoantigene auslösen (Deeg et al. 2001, Deeg 2009). Aktivierte T-Lymphozyten, vor allem CD4+ T-Zellen, durchdringen die BRS und gelangen so ins Innere des Pferdeauges, wo sie intraokuläre Strukturen infiltrieren

und zerstören (Deeg et al. 2001, Gilger et al. 2010). Dieser Einstrom von Entzündungszellen in das Augeninere ist bedingt durch einen Zusammenbruch der BRS bei an ERU erkrankten Tieren (Deeg et al. 2004, Deeg et al. 2007a). Die BRS besteht aus zwei Komponenten, einer inneren und einer äußeren Barriere (Cunha-Vaz 1976) und ist maßgeblich daran beteiligt das Immunprivileg des Auges (Streilein 1999) aufrecht zu erhalten (Crane and Liversidge 2008, Mochizuki et al. 2012). Da die BRS sich direkt zwischen der Blutseite und dem Auginneren befindet, steht sie mit den im Blut zirkulierenden Immunzellen und Antikörpern als wichtige Barriere-Struktur in direktem Kontakt. Neben T-Lymphozyten wurden Autoantikörper gegen retinale Antigene in Glaskörperproben erkrankter Tiere gefunden, wohingegen absolut keine Antikörper in Glaskörperproben gesunder Kontrolltiere nachgewiesen wurden (Deeg et al. 2001).

Mechanismen, welche die Entstehung charakteristisch wiederkehrender Entzündungsschübe bei der ERU, sowie bei anderen immun-medierten Erkrankungen wie beispielsweise Multipler Sklerose erklären können, sind molekulare Mimikry, die Bystander Aktivierung, sowie Epitop Spreading (Deeg et al. 2006a, Fujinami et al. 2006). Das Phänomen des Epitop Spreading bei der ERU konnte 2006 in einer Studie nachgewiesen werden (Deeg et al. 2006a). In einem Vergleich der Immunreaktivität von T-Lymphozyten gegen Epitope von S-Ag und IRBP bei gesunden und kranken Tieren wurde gezeigt, dass bei den kranken Tieren sich die Reaktivität von T-Lymphozyten gegen Epitope des IRBP zu einer Reaktivität gegen Epitope des S-Ag verschob (Deeg et al. 2006a). Dieses als intermolekulares Epitop Spreading bezeichnete Phänomen, bei dem die Verschiebung der T-Zell-Reaktivität von einem Epitop zum nächsten mit einer erneuten Entzündungsphase einhergeht, könnte ein Schlüsselement für den spezifischen periodischen Verlauf der ERU darstellen (Deeg et al. 2006a).

2.1.3 Klinisches Bild und Histopathologie der ERU

Das klinische Bild einer ERU kann sehr vielfältig sein, zumal sich bei einem an ERU erkrankten Tier Phasen der akuten Entzündung des betroffenen Auges mit Phasen der Symptomlosigkeit abwechseln, was, zusammen mit den typischen klinischen

Symptomen, ein Charakteristikum der ERU darstellt (Gilger and Michau 2004). Außerdem können die Entzündungsschübe in ihren Schweregraden variieren und nach einer Phase der Symptomlosigkeit einen noch schwereren klinischen Verlauf als zuvor nehmen (Gilger and Michau 2004). Grundsätzlich können Pferde jedes Alters an ERU erkranken, jedoch sind die meisten Tiere 4-6 Jahre alt, wenn sie den ersten Entzündungsschub erleiden (Gilger and Michau 2004).

Zu den typischen klinischen Symptomen, welche bei der ERU entstehen können zählen unter anderem Schmerzhaftigkeit, Photophobie, Blepharospasmus, Lakrimation und Miosis (Spiess 1997, Gilger and Michau 2004). Des Weiteren können Kammerwassertrübung, Hornhaut- und periokuläre Ödeme, hintere Synechien und auch Katarakt entstehen (Gilger and Michau 2004). Bei der ERU kommt es zudem zu einem Zusammenbruch der BRS (Deeg et al. 2007a).

Die innere BRS wird von miteinander verbundenen Endothelzellen retinaler Gefäße, der äußere Anteil der BRS vom dicht miteinander verbundenen retinalen Pigmentepithel (RPE) gebildet (Cunha-Vaz 1976, Kaur et al. 2008). Aktivierte Entzündungszellen, vornehmlich CD4+ T-Lymphozyten sind in der Lage die Barriere zu überwinden und in das Augeninnere zu gelangen (Gilger et al. 1999, Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2007a). Massive subretinale Ansammlungen von Entzündungszellen, worunter Pigment-enthaltende Makrophagen waren, deuteten auf den Übertritt dieser Entzündungszellen durch die äußere Barriere hin (Gilger et al. 1999, Deeg et al. 2002a, Deeg et al. 2002b). Pferde weisen vergleichsweise eine weitgehend avaskuläre Retina auf (Ehrenhofer et al. 2002), was dem RPE als Barriere eine entscheidende Rolle im Pferdeauge verleiht.

Mit dem Zusammenbruch der Schranke und der Einwanderung von Entzündungszellen entstehen Gewebeveränderungen an der Retina, die sich histologisch zu allererst an den dem RPE direkt benachbarten äußeren Segmenten der Photorezeptoren zeigen (Deeg et al. 2002a). Mit zunehmender Stärke der Entzündung weitete sich die Zerstörung des Gewebes immer weiter aus und führt zum Verlust retinaler Architektur, Entstehung subretinaler Ödeme und schließlich zur Ablösung der Retina – ausgehend von den äußeren Segmenten der Photorezeptoren über die äußere Körnerschicht, Horizontal- und Bipolarzellen, bis hin zur inneren Körnerschicht der Retina (Deeg et al. 2002a). Entzündungsbedingte Veränderungen des Gewebes sind jedoch nicht nur auf die Retina beschränkt, denn es lassen sich

lymphoide Follikel auch in anderen wichtigen Strukturen des Pferdeauges, wie der Iris und dem Ziliarkörper wiederfinden (Gilger et al. 1999, Deeg et al. 2002a).

Interessanterweise schreiten diese histopathologischen Veränderungen auch in einer Phase der klinischen Symptomlosigkeit und nicht nur während einer Phase der akuten Entzündung voran (Deeg et al. 2002a, Deeg et al. 2002b).

2.2 Autoimmune Uveitis

2.2.1 Autoimmune Uveitis des Menschen

Uveitis bezeichnet eine klinisch vielfältige Gruppe von entzündlichen Erkrankungen des inneren Auges, die häufig bei heranwachsenden und jungen Menschen vorkommt und charakterisiert wird durch Beeinträchtigung des Sehvermögens, Zerstörung von retinalem Gewebe - bis hin zur Erblindung (Barisani-Asenbauer et al. 2012, Ruggieri et al. 2012). Abhängig vom Schweregrad kann die Entzündung viele Gewebe des Auges, wie Choroidea, Iris, Ziliarkörper, Sklera, Kornea, Glaskörper, sowie Retina und den optischen Nerv nachhaltig schädigen (Barisani-Asenbauer et al. 2012). Aufgrund experimenteller und klinischer Arbeiten wurden immun-medierte Mechanismen für die Aufrechterhaltung der entzündlichen Prozesse im Auge verantwortlich gemacht (Caspi 2010, Ruggieri et al. 2012). Diese können traumatisch bedingt sein (Mete et al. 2011), im klinischen Verlauf systemischer Erkrankungen, wie beispielsweise Multipler Sklerose, Sarkoidose, Morbus Behçet oder der Vogt-Koyanagi-Harada-Erkrankung entstehen, oder wenn kein Auslöser bekannt ist, autoimmuner Natur sein (Caspi 2010, Mochizuki et al. 2012, Soheilian et al. 2013). Der Schweregrad der Uveitiden beim Menschen variiert beträchtlich, von selbstlimitierend, über wiederkehrend, bis hin zu chronisch (Soheilian et al. 2013). Patienten mit Uveitis unbekannter Ätiologie zeigen häufig Immunreaktionen gegen die retinalen Proteine S-Ag und IRBP, jedoch ist immer noch unklar, ob Immunreaktionen gegen diese Autoantigene der Auslöser für das immun-medierte Geschehen sind (Caspi 2010). Lange Zeit galten Kortikosteroide (topisch oder systemisch angewandt), als einzige Therapiemöglichkeit bei autoimmuner Uveitis (Lee and Dick 2012, Soheilian et al. 2013). Das Repertoire an einsetzbaren

Therapiemöglichkeiten wurde durch die Einführung neuer chirurgischer Behandlungsmethoden, wie der Pars-Plana-Vitrektomie ergänzt (Svozilkova et al. 2011, Soheilian et al. 2013). Da jedoch die immunsuppressive Behandlung bei autoimmuner Uveitis immer noch an erster Stelle steht, wird ständig an weiteren neuen immunsupprimierenden Therapeutika mit geringeren Nebenwirkungen als bisher geforscht (Hennig et al. 2012). Die Einführung und Etablierung einer experimentell induzierbaren autoimmunen Uveitis (EAU) im Tiermodell (Aronson 1965, Wacker and Lipton 1965) und die damit im Zusammenhang stehende Entdeckung des retinalen Autoantigens S-Ag von Wacker und seinen Kollegen (Wacker et al. 1977), sowie weiterer Autoantigene führte dazu, dass sich seitdem das Verständnis für pathologische Mechanismen bei der autoimmunen Uveitis ständig verbesserte (Mochizuki et al. 2012). Die jedoch bisher unbekannte Ätiologie und genaue Pathogenese, sowie das Fehlen kausaler Therapiemöglichkeiten verdeutlichen warum auch heute noch intensive Forschung auf dem Gebiet der autoimmunen Uveitis des Menschen betrieben werden muss.

2.2.2 Experimentell induzierbare autoimmune Uveitis (EAU)

In der Mitte des 20. Jahrhunderts wurden tierexperimentelle Versuche durchgeführt, bei denen Meerschweinchen homogenisierte, in Freund's Adjuvans gelöste Uvea oder Retina als Gewebelysat subkutan injiziert wurde, woraufhin die Tiere eine Uveitis entwickelten (Aronson 1965, Wacker and Lipton 1965). Aronson, der die gesamte Uvea als Gewebelysat injizierte, konnte bei über 50% der Meerschweinchen eine Uveitis auslösen (Aronson 1965). Wacker, der Retina als Gewebelysat injizierte, konnte sogar bei über 80% der Tiere eine Uveitis hervorrufen (Wacker and Lipton 1965). Diese Forscher bezogen sich damals schon auf Versuche und Thesen aus den Anfängen des 20. Jahrhunderts von Elschnig und Collins (Aronson 1965), die Uveitis als ein autoimmunes Geschehen mit Beteiligung von Autoantigenen in Betracht zogen (Aronson 1965). Ihre Forschungsarbeiten bildeten die Grundlage für die spätere Entdeckung des S-Ag als retinales Autoantigen bei der autoimmunen Uveitis (Wacker et al. 1977).

So entwickelten sich im Laufe der Zeit *in vitro*- und Tiermodelle, die die Erforschung

vieler grundlegender Fragestellungen entzündlicher Erkrankungen des Auges, sowie die Entdeckung retinaler Autoantigene zuließen (Nussenblatt 1990). Zu den am besten charakterisierten Autoantigenen zählen das S-Ag, ein 48 kDa-Protein, welches eine Rolle bei der Phototransduktion des Auges spielt und IRBP, ein 140-kDa großes Protein, welches unter anderem Vitamin A Derivate zwischen den Photorezeptoren und dem RPE transportiert (Caspi 1999). Im Tiermodell konnte eine Uveitis experimentell bislang bei Meerschweinchen (De Kozak et al. 1976), Kaninchen (Eisenfeld et al. 1987), Ratten (Wildner et al. 2008), Mäusen (Caspi et al. 1988), Pferden (Deeg et al. 2002b, Deeg et al. 2004, Deeg et al. 2006b) und Primaten (Sanui et al. 1990) induziert werden. S-Ag stellt ein Uveitogen bei Meerschweinchen, Ratten und Primaten dar, wohingegen IRBP stark uveitogen bei Ratten, Mäusen, Kaninchen, Pferden und Primaten wirkt (Deeg et al. 2002b, Gasparin et al. 2012). Durch S-Ag konnte auch eine Uveitis beim Pferd ausgelöst werden, jedoch war das uveitogene Potential von S-Ag beim Pferd geringer (1 von 5 Pferden entwickelte eine Uveitis), als das von IRBP (Uveitis bei allen immunisierten Tieren ausgelöst) (Deeg et al. 2004). Bei Lewis-Ratten löste S-Ag eine Uveitis mit deutlichen Veränderungen an der Retina und der Choroidea aus, wohingegen die klinischen Anzeichen einer Uveitis bei Meerschweinchen und Primaten schwächer ausgeprägt waren (Gasparin et al. 2012). Die klinischen und pathologischen Charakteristika der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) hängen somit von der Spezies und dem injizierten Antigen ab, jedoch haben alle gemein, dass eine T-Zell-medierte Immunantwort mit vornehmlicher Beteiligung von CD4⁺ T-Lymphozyten induziert wird (Gasparin et al. 2012, Mochizuki et al. 2012) und dass es zu einem Zusammenbruch der BRS kommt (Greenwood et al. 1994, Nicholson et al. 2012). Mit der erfolgreichen Induktion der EAU im Mausmodell (Caspi et al. 1988) wurde eine Möglichkeit geschaffen, die Mechanismen der EAU an transgenen und Knock-Out-Mäusen zu erforschen (Mochizuki et al. 2012). Auch die Ratte wurde aufgrund der Induzierbarkeit von Uveitis mit den genannten Antigenen als Tiermodell zur Erforschung der EAU herangezogen (Wildner et al. 2008). Obwohl diese Nagermodelle überaus wertvoll für die Erforschung der pathologischen Mechanismen der Uveitis waren und immernoch sind, spiegelt keines entsprechende klinische und histopathologische Veränderungen analog zur autoimmunen Uveitis des Menschen, in ihrer gesamten Komplexität wieder (Caspi et al. 1988, Caspi 2010).

Nichtsdestotrotz scheinen EAU Modelle zentrale Eigenschaften der Erkrankung beim Menschen, wie die Reaktivität gegen S-Ag und IRBP, sowie eine T-Zell-medierte Immunantwort wiederzugeben und sind somit für die Erforschung der autoimmunen Uveitis beim Menschen unerlässlich geworden (Caspi 2010).

2.2.3 Die ERU als Modell für die autoimmune Uveitis des Menschen

Die ERU weist im Gegensatz zu anderen experimentell induzierten Tiermodellen den Vorteil auf, dass sie sich spontan entwickelt, was eine direkte Übertragbarkeit vieler Pathogenese-assoziiierter Mechanismen auf die autoimmune Uveitis des Menschen möglich macht und beschert der ERU somit als Tiermodell einen besonderen Stellenwert (Deeg et al. 2008). Es herrscht eine deutliche Übereinstimmung zwischen der ERU und der autoimmunen Uveitis des Menschen bezüglich ihrer klinischen und immunpathologischen Ausprägung (Deeg et al. 2002a, Deeg et al. 2008). Wie bei der autoimmunen Uveitis des Menschen und den beschriebenen Tiermodellen, beispielsweise dem Maus- oder Rattenmodell (Wildner et al. 2008, Caspi 2010) wurden S-Ag und IRBP als retinale Autoantigene bei der ERU identifiziert (Deeg et al. 2002b, Deeg et al. 2004). Durch die Etablierung der Trans-Pars-Plana-Vitrektomie als Behandlungsmethode der ERU in der Veterinärmedizin (Werry and Gerhards 1992) wurde die Zugänglichkeit zu Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden als Probenmaterial in großen Mengen ermöglicht, was einen Vorteil bei der Suche nach weiteren Autoantigenen in der Uveitisforschung darstellt.

So konnten neben S-Ag und IRBP im Laufe der Zeit weitere Autoantigene, darunter CRALBP, ein bis dahin noch unbekanntes retinales Autoantigen, bei der ERU identifiziert werden (Deeg et al. 2006b). Durch subkutane Injektion von CRALBP (gelöst in Freund's Adjuvans) konnte Uveitis bei gesunden Pferden induziert werden und durch Re-Injektion auch wiederkehrende Entzündungsschübe ausgelöst werden (Deeg et al. 2006b). Auch im Rattenmodell (Lewis-Ratte) konnte durch Injektion von CRALBP experimentell Uveitis mit einer Inzidenz von 100% ausgelöst werden, jedoch war diese Uveitis im Gegensatz zu der beim Pferd eine monophasische, nicht re-induzierbare Uveitis (Deeg et al. 2006b). Kurz darauf konnte CRALBP auch als Autoantigen bei der autoimmunen Uveitis des Menschen bestätigt werden und

machte somit das Pferd zu einem der wichtigsten Tiermodelle in der Uveitisforschung (Deeg et al. 2007b).

Ein weiterer Aspekt, der das Pferd zu einem höchst wertvollen Modelltier in der Uveitisforschung macht, ist die Tatsache, dass Uveitis beim Pferd zum einen spontan in Form von ERU, zum anderen auch experimentell durch die Injektion von retinalen Autoantigenen induziert werden kann (Deeg et al. 2002b, Deeg et al. 2004, Deeg et al. 2006b). Dabei wurde gezeigt, dass IRBP ein äußerst potentes Uveitogen darstellt, welches Uveitis bei allen immunisierten Pferden induzieren konnte und in ihrer entweder einseitigen oder beidseitigen Ausprägung der spontan auftretenden Erkrankung entsprach (Deeg et al. 2002b). Eine einzigartige Besonderheit bestand darin, dass sich die Entzündungsschübe bei allen Tieren an verschiedenen Zeitpunkten durch erneute Injektion von IRBP re-induzieren ließen (Deeg et al. 2002b). Die induzierten, sowie re-induzierten Entzündungsschübe bei den Tieren waren zeitlich präzise absehbar, was einen Vorteil gegenüber anderen Tiermodellen, wie dem Mausmodell, darstellt, das nur kaum vorhersehbare spontane Rezidive aufweist (Caspi 1999, Deeg et al. 2002b).

Das uveitogene Potential bei der experimentellen Induktion der Uveitis mit S-Ag beim Pferd erwies sich als deutlich geringer, mit nur einem klinisch erkrankten Tier von insgesamt fünf getesteten (Deeg et al. 2004). Dieses Pferd entwickelte eine Uveitis mit einem monophasischen Verlauf bei dem eine Re-induzierbarkeit des klinisch erkrankten Tieres ohne Erfolg blieb, was dem charakteristischen Bild der ERU als rezidivierende Erkrankung beim Pferd widerspricht (Deeg et al. 2004).

Nach der Identifizierung von CRALBP als weiteres potenzielles Autoantigen wurden Induktionsversuche auch mit diesem Protein durchgeführt, im Zuge dessen gesunden Pferden subkutan in Freund's Adjuvans gelöstes CRALBP injiziert und eine Uveitis mit einer Inzidenz von 100% induziert werden konnte (Deeg et al. 2006b). Im Vergleich zu den Uveitiden, die durch IRBP ausgelöst wurden, beschränkten sich die Entzündungserscheinungen nach CRALBP-Induktion auf den hinteren Bereich des Auges (Deeg et al. 2006b). Die Entzündungsschübe konnten, wie bei der Induktion mit IRBP, durch erneute Injektion re-induziert werden (Deeg et al. 2006b).

Ein weiterer Punkt, der für die Wichtigkeit des Pferdes als Tiermodell spricht, liegt in der guten Verfügbarkeit von vielfältigem Probenmaterial augengesunder Tiere.

Aufgrund der Bezugsmöglichkeit von Material aus Pferdeschlachthöfen ist man in der Lage vergleichende Analysen zwischen gesunden und erkrankten Tieren durchzuführen. So kann man beispielsweise das retinale Proteom gesunder Tiere mit dem von an ERU erkrankten Tieren vergleichen und hat dadurch die Möglichkeit differenziell regulierte Proteine und auch weitere Autoantigene aufzudecken.

Die ERU stellt wegen ihrer spontan entstehenden Entzündungsschübe und der damit verbundenen Übertragbarkeit auf die autoimmune Uveitis des Menschen (Deeg et al. 2007b, Deeg et al. 2008), aber gleichzeitig auch wegen ihrer Induzierbarkeit (Deeg et al. 2002b) ein sehr wertvolles Tiermodell für die Erforschung der Erkrankung beim Menschen dar. Die ERU ermöglicht die bei Beobachtung der spontanen Erkrankung entstandenen Hypothesen direkt im Tiermodell zu verifizieren, indem das Pferd selbst als Versuchstier dient (Deeg et al. 2008).

2.3 Die Blut-Retina-Schranke (BRS)

2.3.1 Das Immunprivileg des Auges

Im Jahr 1948 beobachtete Peter Medawar, dass transplantierte Hautstücke in der vorderen Augenkammer von Kaninchen, solange noch keine Blutgefäße in das betroffene Gebiet eingewachsen waren, länger verweilten als in anderen Bereichen des Körpers, ohne dass es zu einer Abstoßungsreaktion kam (Medawar 1948). Er war der erste, der die immunologische Signifikanz dieses Verweilens von transplantierten Hautstücken in der vorderen Augenkammer erkannte und prägte mit seinen damaligen Erkenntnissen den heutigen Begriff „Immunprivileg des Auges“ (Medawar 1948, Niederkorn and Stein-Streilein 2010, Taylor and Kaplan 2010). Das Auge zählt neben dem Gehirn, dem Rückenmark, den Hoden und dem Uterus zu dieser Gruppe von Organen, die man als immunprivilegierte Organe bezeichnet (Benhar et al. 2012). Die Hypothese ist, dass sich dieses Privileg im Laufe der Evolution bei diesen unverzichtbaren Geweben, die eine eher geringe Regenerationsfähigkeit aufweisen, entwickelt hat (Benhar et al. 2012). Frühere Ansichten, dass das Immunprivileg darin besteht, Immunzellen völlig aus den privilegierten Organen auszugrenzen, werden immer mehr durch die These ersetzt,

dass dieser privilegierte Status darin besteht, dass diese Organe eine Immunantwort gegen bestimmte Antigene lediglich unterdrücken und limitieren (Nieder Korn and Stein-Streilein 2010, Benhar et al. 2012). Das Immunprivileg stellt nach heutigem Verständnis also keine immunologische Ignoranz der jeweiligen Organe dar, sondern mehr einen dynamischen Prozess, welcher verschiedene physiologische, anatomische und immunologische Eigenschaften vereint (Nieder Korn and Stein-Streilein 2010, Nieder Korn 2012). Zu den immunologischen Eigenschaften zählen unter anderem viele verschiedene immunsupprimierende Faktoren, wie Transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF β), Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) oder Makrophagen-Migrations-inhibitorischer Faktor (MIF), welche beispielsweise in der vorderen Augenkammer vorhanden sind (Nieder Korn and Stein-Streilein 2010). Aber auch das RPE vermag immun-modulatorisch wirksame Mediatoren, wie CD54 und Prostaglandin E2 zu produzieren und trägt somit aktiv zum Immunprivileg des Auges bei (Wallace et al. 2013). Des Weiteren gibt es membrangebundene Moleküle auf der Oberfläche verschiedener Zellen des Augeninneren, die Apoptose bei aktivierten T-Lymphozyten induzieren können, wenn es solche ins Augeninnere geschafft haben (Nieder Korn and Stein-Streilein 2010). Sowohl die gelösten, als auch die zellgebundenen Moleküle sind grundsätzlich in der Lage, Immunantworten von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems zu unterdrücken (Nieder Korn and Stein-Streilein 2010). Zu den anatomischen Eigenschaften des Immunprivilegs des Auges zählen zum einen das Fehlen des Lymphabflusses im Auge (Taylor 2009), zum anderen anatomische Strukturen, wie die Kornea, Konjunktiva, Uvea und periokuläre Faszien, die eine Reihe von Zellen des angeborenen Immunsystems beherbergen und somit in der Lage sind bei Bedarf Mediatoren freizusetzen und so das Immunprivileg des Auges zu bewahren (Forrester and Xu 2012). Eine weitere anatomische Besonderheit des Auges, die einen wichtigen Bestandteil des Immunprivilegs des Auges darstellt ist die BRS (Crane and Liversidge 2008, Taylor 2009, Forrester and Xu 2012), auf welche im Folgenden eingegangen wird.

2.3.2 Aufbau und Funktion der BRS

Strukturen, die im Augenninneren lokalisiert sind, werden durch die BRS vom Blut- und Lymphgefäßsystem getrennt (Forrester and Xu 2012). Die BRS umfasst zwei Komponenten, welche als Gesamtheit die BRS bilden. Diese beiden Komponenten werden als innere und äußere BRS bezeichnet und werden im Fall der inneren BRS durch das Endothel retinaler Gefäße und im Fall der äußeren BRS durch das RPE gebildet (Kaur et al. 2008, Forrester and Xu 2012). Die innere BRS wird geprägt durch das Vorhandensein dichter interzellulärer Verbindungen, den sogenannten Tight-Junctions, zwischen den einzelnen Endothelzellen retinaler Gefäße (Kaur et al. 2008). Die Besonderheit retinaler Gefäße liegt darin, dass ihnen durch das Vorhandensein der Tight-Junctions der inneren BRS eine Dichtigkeit verliehen wird, welche den Übertritt von Entzündungszellen und anderen Makromolekülen aus dem Blutkreislauf in das Augenninnere einschränkt (Kaur et al. 2008, Niederkorn and Stein-Streilein 2010). Weitere Strukturen, die im Wesentlichen den Aufbau und die Funktionalität der inneren BRS prägen, sind Astrocyten, Pericyten, Müllerzellen und eine Basalmembran (Kaur et al. 2008).

Die äußere BRS wird gebildet vom RPE, dessen einzelne Zellen ebenfalls durch interzelluläre Tight-Junctions dicht miteinander verbunden sind (Kaur et al. 2008). Das RPE sitzt mit seiner basalen Seite einschichtig auf der pentalaminären Bruch-Membran (Sato et al. 2012), welche das RPE von der darunterliegenden fenestrierten Choriocapillaris trennt (Kaur et al. 2008). Mit seiner apikalen Seite steht es im direkten Kontakt mit den äußeren Segmenten der retinalen Photorezeptoren (Kaur et al. 2008). Aufgrund der anatomischen Lage obliegt der BRS eine wichtige Aufgabe bei der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des Auges (Crane and Liversidge 2008). Zudem ist ihre physiologische Funktion essentiell für die strukturelle und funktionelle Integrität der Retina sowie ein intaktes Sehvermögen, das durch eingewanderte Makromoleküle in den transparenten Glaskörper getrübt und beeinträchtigt werden kann (Kaur et al. 2008, Wisniewska-Kruk et al. 2012). Die Charakterisierung des RPE und dessen spezifische Funktionen werden im Abschnitt 2.4 (Das RPE und dessen Bedeutung in der Retina) behandelt.

2.3.3 Zusammenbruch der BRS bei ERU und weiteren Augenerkrankungen

Die BRS stellt einen anatomischen Baustein des Immunprivilegs des Auges dar und trägt deshalb zum Schutz des Auges vor zerstörerischen Entzündungsprozessen bei (Crane and Liversidge 2008). Zellen, wie aktivierte Leukozyten, die diese Schranke passieren wollen, werden aufgehalten und inaktiviert, um die Gefahr vor schädigenden Immunantworten innerhalb des Auges zu entschärfen (Crane and Liversidge 2008). Jedoch kommt es immer wieder vor, dass Zellen es schaffen die BRS zu überwinden und dadurch retinale Entzündungsprozesse auslösen, ein Phänomen, das als Zusammenbruch der BRS bezeichnet wird (Crane and Liversidge 2008). Es stellt einen komplexen Prozess dar, an dem verschiedene Faktoren, wie Adhäsionsmoleküle, oder Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Tumor-Nekrose Faktor alpha (TNF α) oder Interferon gamma (IFN γ), beteiligt sind (Crane and Liversidge 2008). Von einem Zusammenbruch der BRS wird im Zusammenhang mit vielen entzündlichen, degenerativen Erkrankungen des inneren Auges, wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) (Morohoshi et al. 2009), der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) (Alge-Priglinger et al. 2011, Sadaka and Giuliari 2012), der diabetischen Retinopathie (Silva et al. 2013), der EAU (Greenwood et al. 1994, Nicholson et al. 2012), sowie der ERU (Deeg et al. 2007a, Hauck et al. 2012) berichtet.

Bei der AMD handelt es sich um eine der häufigsten Ursachen von Sehstörungen älterer Menschen in entwickelten Ländern (Chen Y. et al. 2010). Die Ätiologie der AMD ist noch nicht klar, als Hauptursachen werden jedoch eine Beeinträchtigung der Funktionen des RPE angenommen, die durch Alterungsprozesse, schädigende Aktivierung des Immunsystems oder durch Sauerstoffradikale bedingt sein können (Chen Y. et al. 2010). Verschiedene Faktoren, unter anderem hohes Alter, Rauchen, genetische Komponenten oder Bluthochdruck gelten als Risikofaktoren, die die Entstehung einer AMD begünstigen (Kinnunen et al. 2012). Aufgrund der gestörten Funktion des RPE, deren genaue Ursache bisher noch nicht bekannt ist, kommt es zur Degeneration von Photorezeptoren im Bereich der Makula und somit zum Verlust des zentralen Sehvermögens - bis hin zur Erblindung (Chen Y. et al. 2010, Kinnunen et al. 2012). Es gibt verschiedene Stadien der AMD, die alle charakteristische

subretinale Ablagerungen von Lipiden, Proteinen und zellulärem Debris, sogenannte Drusen, aufweisen (Chen Y. et al. 2010). In fortgeschrittenen Stadien der AMD kommt es zur Neovaskularisation im Bereich der Choroidea, die zur Folge haben kann, dass subretinale neovaskuläre Membranen, Flüssigkeitsansammlungen, Blutungen und die damit verbundene Ablösung des RPE vom Augenhintergrund entstehen können – dies wird als exsudative oder feuchte AMD bezeichnet (Chen Y. et al. 2010). Eine vermehrte Expression des vasoaktiven Proteins VEGF wird unter anderem für die Neovaskularisation bei der AMD verantwortlich gemacht (Naginei et al. 2012).

Der Begriff proliferative Vitreoretinopathie (PVR) wurde 1983 vom Retina Society Terminology Komitee geprägt, um einen Krankheitsverlauf zu beschreiben, der durch eine Netzhautablösung ausgelöst wird und sekundär mit der Formierung ektopischer Zellfragmente im Glaskörper und im periretinalen Raum einhergeht (Sadaka and Giuliani 2012). Bei diesen Fragmenten handelt es sich um proliferierende und migrierende narbenähnliche Bindegewebsstücke, die aus transdifferenzierten RPE- oder Gliazellen entstanden sind (Zhang W. et al. 2012). Die Proliferation, Migration und Differenzierung dieser Gewebe wird zu einem großen Teil durch Zytokine und Wachstumsfaktoren gefördert, die durch die retinale Schädigung vermehrt exprimiert werden, oder von der Blutseite her Zugang zum Auginneren gefunden haben (Sadaka and Giuliani 2012). Erhöhte Werte an VEGF konnten in Glaskörperproben von PVR-Patienten gemessen werden (Citirik et al. 2012). Die Pathogenese der PVR ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird ein autoimmunes Geschehen nicht ausgeschlossen, da man im Glaskörper von PVR-Patienten IgG, IgA, IgE, Komplementfragmente, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, sowie Makrophagen gefunden hat (Zhang W. et al. 2012). Diese können nur über eine gestörte BRS ins Innere des Auges eines PVR-Patienten gelangen, die aufgrund der vorangegangenen Netzhautablösung entstanden ist (Sadaka and Giuliani 2012). Eine erhöhte Konzentration an S-Ag-spezifischen Autoantikörpern konnte ebenfalls im Serum von PVR-Patienten nachgewiesen werden, was zusätzlich für ein immunmediertes Geschehen bei der PVR spricht (Grisanti et al. 1994, Zhang W. et al. 2012).

Die diabetische Retinopathie stellt eine neurodegenerative retinale Erkrankung dar, die aufgrund der schädigenden metabolischen Wirkung einer Hyperglykämie entsteht

(Silva et al. 2013). Eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der diabetischen Retinopathie spielt die gestörte BRS (Silva et al. 2013). Mikrovaskuläre Funktionsstörungen, nämlich eine erhöhte Durchlässigkeit auf der einen, sowie Gefäßverschluss auf der anderen Seite, führen zu retinaler Neovaskularisation und zu Ödemen im Bereich der Makula (Bandello et al. 2013). Aufgrund einer erhöhten Konzentration verschiedener Entzündungsmediatoren, wie VEGF, Stickstoffmonoxid, sowie Zytokinen und Chemokinen kommt es zu Entzündungsreaktionen im betroffenen Bereich (Bandello et al. 2013). Viele der Entzündungsmediatoren sind maßgeblich am Zusammenbruch der BRS beteiligt (Bandello et al. 2013). So fördert VEGF bei diabetischer Retinopathie die Durchlässigkeit von Gefäßen, indem es interzelluläre Verbindungen, die Tight-Junctions, schwächt und so die gesamte Barriere beeinträchtigt (Bandello et al. 2013). Obwohl das Auftreten von Diabetes in entwickelten Ländern immer mehr ansteigt ist die Prävalenz der diabetischen Retinopathie im Vergleich zu früher gesunken und ist auf die heutigen Blutzucker-, Blutdruck-, sowie Blutfettkontrollen, sowie die erfolgreiche Therapie des Diabetes zurückzuführen (Bandello et al. 2013, Ruta et al. 2013).

Ein Zusammenbruch der BRS findet ebenfalls bei der EAU statt, was im Mausmodell durch Immunisierung mit IRBP (Xu et al. 2003) und im Rattenmodell durch Immunisierung mit S-Ag (Luna et al. 1997) gezeigt werden konnte. In beiden Modellen kam es nur wenige Tage nach Immunisierung zu einer gesteigerten Durchlässigkeit der Gefäße (Luna et al. 1997, Xu et al. 2003), die im Rattenmodell immunhistochemisch mit einer vermehrten Extravasation von Albumin aus retinalen Gefäßen sichtbar gemacht wurde (Luna et al. 1997). Im weiteren Verlauf der Entzündung konnten bei der Ratte Albumin-gefüllte Vakuolen innerhalb von RPE-Zellen gezeigt werden und schließlich wurde Albumin auch im subretinalen Raum nachgewiesen, was bedeutete, dass auch die äußere BRS überwunden wurde (Luna et al. 1997). Bereits früher konnte der Zusammenbruch der BRS auch bei der Immunisierung von Kaninchen mit IRBP gezeigt werden (Eisenfeld et al. 1987). Da das Kaninchen wie das Pferd eine nahezu avaskuläre Retina aufweist (Yu and Cringle 2001, Ehrenhofer et al. 2002) scheint auch bei dieser Tierart vor allem die äußere BRS beim Zusammenbruch beteiligt zu sein (Eisenfeld et al. 1987). Wie bei den bisher genannten entzündlichen Erkrankungen, wird auch bei der EAU über eine entscheidende Rolle von VEGF im Zusammenhang mit einer Störung der

Barrierefunktion diskutiert (Luna et al. 1997, Vinoses et al. 1998, Xu et al. 2003). Beim Pferd konnte gezeigt werden, dass durch die Immunisierung mit S-Ag, IRBP, sowie CRALBP eine Uveitis ausgelöst werden kann, wodurch es ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Barrierestruktur im Pferdeauge kommt (Deeg et al. 2002b, Deeg et al. 2004, Deeg 2009). Mit Hilfe der differentiellen Proteomanalytik von Glaskörperproben von Pferden wurde gezeigt, dass bestimmte Proteine in Glaskörpern von an ERU erkrankten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrollen differentiell reguliert waren (Deeg et al. 2007a). Es wurden hohe Konzentrationen an Albumin in ERU-Augen gefunden, die bereits auf eine gestörte Barrierefunktion hindeuteten (Deeg et al. 2007a). Des Weiteren war Apolipoprotein A1 erhöht, ein Protein, welches von RPE Zellen exprimiert wird und auch als differentiell reguliertes Protein im RPE und der Retina bei Menschen, die an diabetischer Retinopathie leiden, beschrieben wurde (Deeg et al. 2007a, Simo et al. 2009). Ein Protein, dessen Konzentration in kranken Glaskörperproben gegenüber gesunden erniedrigt war, ist Pigment epithelium-derived factor (PEDF) (Deeg et al. 2007a). PEDF stellt nicht nur einen potenten Inhibitor der Angiogenese dar, sondern ist auch für die Stabilisierung interzellulärer Tight-Junctions und somit für die Integrität von Barrierestrukturen verantwortlich (Deeg et al. 2007a, Ablonczy et al. 2011). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass an Stellen der Retina, wo PEDF erniedrigt war, die Expression von VEGF hochreguliert war (Deeg et al. 2007a).

Bei den genannten entzündlichen Augenerkrankungen des Menschen, bei der EAU, aber auch bei der ERU des Pferdes spielte das vasoaktive Protein VEGF eine Rolle im Zusammenhang mit Veränderungen der physiologischen Barrierefunktion. Da VEGF im Auge vornehmlich von RPE Zellen produziert wird (Ablonczy et al. 2011), spricht auch dies für eine entscheidende Beteiligung des RPE an der Pathogenese der genannten Augenerkrankungen.

2.4 Das RPE und dessen Bedeutung in der Retina

Das Vorhandensein einer physiologischen BRS ist essenziell für die strukturelle und funktionelle Integrität der Retina (Kaur et al. 2008).

Als Bestandteil der BRS bildet das RPE aufgrund seiner Lage zwischen der

Choriocapillaris und den Photorezeptoren der Retina eine wichtige Barriere (Kaur et al. 2008). Das Pferd ist aufgrund seiner weitgehend avaskulären Retina (Ehrenhofer et al. 2002) größtenteils auf das RPE als Barrierestruktur für den physiologischen Funktionserhalt der Retina angewiesen.

2.4.1 Lage und Charakterisierung des RPE

Die äußere BRS wird vom RPE, sowie dessen interzellulär lokalisierten Tight-Junctions gebildet (Kaur et al. 2008, Simo et al. 2010). Bereits einfachste Licht-wahrnehmende Organe bei Insekten, Mollusken bis hin zu höher entwickelten Vertebraten, werden von zwei Zellarten gebildet, nämlich Photorezeptorzellen und pigmentierten Zellen (Strauss 1995, Katagiri et al. 2001, Presburg et al. 2002). Diese beiden Zellarten hängen bei ihrer funktionellen Differenzierung bereits in der embryonalen Entwicklungsphase stark voneinander ab (Strauss 1995, Marmorstein et al. 1998a). Zusammen mit den lichtsensitiven Photorezeptoren ist das RPE von größter Bedeutung für die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion des Sehens (Strauss 2005).

Das RPE besteht aus einem einschichtigen pigmentierten Epithel, das von kubischen Zellen gebildet wird, die durch interzelluläre Tight-Junctions dicht miteinander verbunden sind (Simo et al. 2010, Rizzolo et al. 2011). Mit seiner apikalen Seite hat das RPE über einen subretinalen Raum Verbindung zu den äußeren Segmenten der Photorezeptoren, mit seiner basolateralen Seite steht es mit der Bruch-Membran und den fenestrierten, blutführenden Kapillaren der Choroidea in Kontakt (Abb. 1) (Simo et al. 2010). Die wichtigsten Funktionen des RPE wie die Absorption von Licht, Schutz der Retina vor Photooxidation, Phagozytose, transepithelialer Transport, Pufferfunktion, sekretorische Funktionen, sowie wichtige Funktionen im Zusammenhang mit dem Retinalzyklus (Strauss 1995, Simo et al. 2010), werden im Folgenden erläutert.

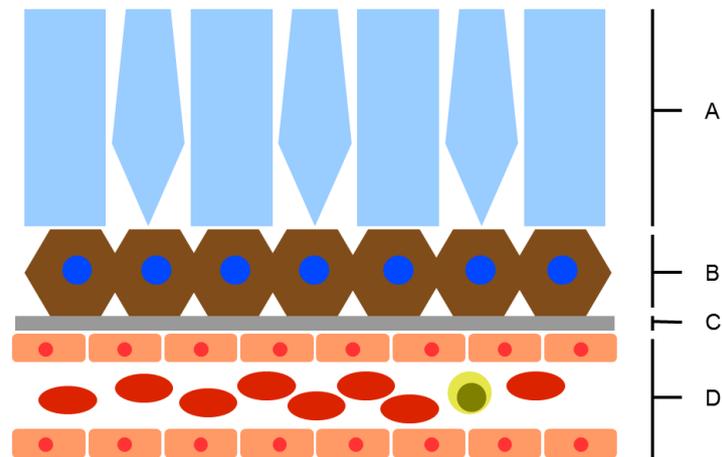


Abb.1: Graphische Darstellung der Lage des RPE *in situ*. Das RPE (**B**) liegt zwischen den apikal lokalisierten Photorezeptoren (**A**) und der basal gelegenen Bruch-Membran (**C**), sowie der fenestrierten Gefäße der Choroidea (**D**).

2.4.2 Lichtabsorption und Schutz der Retina vor Photooxidation durch das RPE

Aufgrund seiner anatomischen Lage hinter der Retina, die ein neuronales Gewebe darstellt, welches einer direkten und häufigen Lichteinstrahlung ausgesetzt ist (Simo et al. 2010), gehört die Absorption des einfallenden Lichts zu einer der Hauptaufgaben des RPE (Hunter et al. 2012). Aufgrund der Lichteinstrahlung kommt es zu einem starken oxidativen Stress im Bereich der Retina durch Photooxidation von Proteinen und Lipiden, mit Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die extrem toxisch für retinale Zellen sind (Simo et al. 2010, Hunter et al. 2012). Zusätzlich weist die Choroidea eine sehr starke Blutperfusion auf, jedoch wird das reichliche Angebot an Sauerstoff nur wenig von der Retina genutzt (Linsenmeier and Padnick-Silver 2000), weshalb es zusätzlich zu oxidativem Stress von der Seite der Choroidea kommt (Jarrett and Boulton 2012). Durch seine pigmentierten Granula kann das RPE einfallendes Licht verschiedener Wellenlängen absorbieren und somit das Risiko der Zerstörung der Retina durch Photooxidation und der damit verbundenen Bildung freier Radikale verringern (Simo et al. 2010). Außerdem besitzt das RPE enzymatische Antioxidantien, wie beispielsweise die Superoxide-Dismutase oder Catalase, die weitere antioxidative Schutzmechanismen für retinales Gewebe darstellen (Simo et al. 2010).

2.4.3 Phagozytosefunktion des RPE

Photorezeptoren sind einer direkten und häufigen Lichteinstrahlung ausgesetzt, was zu einer Anhäufung von durch Photooxidation zerstörter Proteine und Lipide in den Photorezeptoren führt (Sun et al. 2006, Simo et al. 2010). Da sich diese zerstörten Strukturen tagtäglich anhäufen und die physiologische Funktionalität der Photorezeptoren aufrechterhalten werden muss, unterliegen diese kaputten äußeren Segmente der Photorezeptoren einem stetigen Austausch durch neu gebildete (Simo et al. 2010). Die äußeren Segmente, welche die größte Belastung an freien Sauerstoffradikalen oder zerstörten Proteinen und Lipiden aufweisen, werden von den Photorezeptoren abgestreift und ersetzt (Simo et al. 2010). Durch koordiniertes Abstreifen und gleichzeitiges Erneuern der äußeren Segmente wird eine konstante Größe der Photorezeptorzelle eingehalten (Simo et al. 2010). Das unterhalb der Photorezeptoren lokalisierte RPE phagozytiert diese abgestreiften, zerstörten Segmente (Simo et al. 2010). Die Phagozytose durch das RPE findet tagesrhythmisch mit verstärkter Aktivität bei Dunkelheit statt (Irschick et al. 2004, Irschick et al. 2006). Kaputte abgestreifte Segmente der Photorezeptoren werden von RPE-Zellen phagozytiert, wobei eine Kaskade entsteht, die mehrere, zeitlich abgestimmte Stufen beinhaltet, nämlich Erkennung, Bindung, intrazelluläre Informationsleitung, Internalisation und die endgültige Verdauung (Kevany and Palczewski 2010). Die an der Phagozytose im RPE beteiligten Rezeptorproteine sind unter anderem CD36, MerTK und das Integrin $\alpha\beta 5$ (Finnemann and Nandrot 2006, Kevany and Palczewski 2010).

2.4.4 Epitheliale Transportfunktionen des RPE

Das RPE stellt aufgrund seiner Lage zwischen der blutführenden Choroidea und der Retina eine wichtige funktionelle Barriere dar, die einen hohen Stellenwert für das Immunprivileg des Auges hat (siehe 2.3.1 „Das Immunprivileg des Auges“). Somit muss ein selektiver Austausch von Stoffen, wie Elektrolyten, Wasser und Nährstoffen zwischen der Choriocapillaris, der Retina und andersherum über das RPE stattfinden (Joseph and Miller 1991, Simo et al. 2010).

Das RPE entnimmt dem Blut wichtige Nährstoffe, wie Glukose, Retinol,

Ascorbinsäure sowie Fettsäuren und transportiert diese zur retinalen Seite, wo diese Stoffe von den Photorezeptoren der Retina benötigt werden (Simo et al. 2010). Dabei spielt der Bereich zwischen der apikalen Seite der RPE-Zellen und den Photorezeptoren eine wichtige Rolle. Dieser subretinale Raum stellt einen Bereich dar, wo der direkte Austausch von Stoffen zwischen dem RPE und den Photorezeptoren stattfindet (Strauss 2005). Für den transepithelialen Transport von Glukose exprimieren RPE-Zellen basal und apikal spezielle Glukosetransportkanäle (Ban and Rizzolo 2000), wobei GLUT1 einen hoch abundanten Glukosekanal des humanen RPE darstellt (Takagi et al. 1994, Senanayake et al. 2006).

Von den Photorezeptoren zur Choriocapillaris, also von der apikalen zur basalen Seite des RPE werden vornehmlich Wasser, Ionen und metabolische Endprodukte transportiert (Simo et al. 2010). Aufgrund des hohen Metabolismus der Retina entsteht in dieser viel Flüssigkeit, die sich im subretinalen Raum ansammelt (Marmor 1990). Zusätzlich sammelt sich Flüssigkeit aus dem Glaskörper durch intraokulären Druck an (Marmor 1990, Wimmers et al. 2007). Flüssigkeit strömt aufgrund von Ionenverteilungen zwischen dem subretinalen Raum und den RPE-Zellen (vor allem Cl^- - und K^+ Einstrom in die RPE-Zellen) passiv nach, um die osmotische Balance im subretinalen Raum und den RPE-Zellen aufrechtzuerhalten (Wimmers et al. 2007). Da das RPE einen sehr dichten Zellverband darstellt, kann der Wassertransport nicht parazellulär sondern vornehmlich transzellulär erfolgen (Simo et al. 2010). Bei humanen RPE-Zellen wird hierfür ein Kanalprotein, das Aquaporin-1 (AQP1) exprimiert (Stamer et al. 2003, Baetz et al. 2012), das diesen ionengetriebenen Wassertransport durch die RPE-Zellen reguliert (Wimmers et al. 2007). AQP1 wurde auch bei RPE-Zellen anderer Säugetiere wie der Maus beschrieben (Motulsky et al. 2010). Als eines der wichtigsten metabolischen Endprodukte, das von Photorezeptoren gebildet wird, sammelt sich zusätzlich Laktat im subretinalen Raum an (Yoon et al. 1997). In humanen RPE-Zellen wird Laktat apikal über Monocarboxylat-Transporter-1 (MCT1) in die RPE-Zellen aufgenommen (Philp et al. 2003b, Majumdar et al. 2005) und basal über MCT3 zur Blutseite abgegeben (Gallagher-Colombo et al. 2010).

2.4.5 Pufferfunktion des RPE

Das RPE ist in der Lage schnelle Ionenumverteilungen zu kompensieren, die aus lichtabhängigen Veränderungen der K^+ -Konzentration im subretinalen Raum resultieren (Immel and Steinberg 1986, Strauss 2005). Im Dunkeln sind cGMP abhängige Kationenkanäle in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren geöffnet, wobei ein Gleichgewicht zwischen Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die inneren Segmente der Photorezeptoren und Ausstrom von K^+ in den subretinalen Raum herrscht – man bezeichnet dies als Dunkelstrom (Korenbrodt 2012). Trifft nun Licht auf die äußeren Segmente der Photorezeptoren, werden die cGMP abhängigen Kanäle geschlossen, es findet kein Kationenaustausch mehr statt und es kommt zu einer Verringerung der K^+ -Konzentration im subretinalen Raum (Wimmers et al. 2007, Korenbrodt 2012). Dieser Abfall der K^+ -Konzentration wird vom darunterliegenden RPE kompensiert, indem die apikale RPE-Membran hyperpolarisiert und so über Kaliumkanäle K^+ aus den RPE-Zellen in den subretinalen Raum strömen lässt (Korenbrodt 2012). In RPE-Zellen verschiedener Säugetiere, wie dem Menschen, dem Rind und der Ratte wird Kir7.1 als hauptsächlicher Kaliumkanal exprimiert, doch auch die Expression weiterer Untereinheiten wie Kir2.1, Kir3.1, Kir3.4, Kir4.2 und Kir6.1 wurde bei humanen RPE-Zellen nachgewiesen (Kusaka et al. 2001, Yang et al. 2008b). Kaliumkanäle bei RPE-Zellen sind sowohl apikal als auch basal lokalisiert und tragen zur K^+ -Homöostase der Retina und des RPE bei, indem sie Na^+/K^+ ATPasen und andere Transportproteine bei der Ionenumverteilung unterstützen (Yang et al. 2008a, Pattnaik and Hughes 2009).

2.4.6 Sekretorische Eigenschaften des RPE

Das RPE besitzt sekretorische Eigenschaften, indem es eine Reihe von Wachstumsfaktoren und anderer Moleküle an die umgebenden Strukturen entsendet, um mit diesen zu kommunizieren und dadurch den Erhalt und die Integrität der apikal lokalisierten Retina und der basal des RPE gelegenen Choriocapillaris aufrechtzuerhalten (Strauss 1995, Simo et al. 2010). Faktoren, die das RPE an

benachbarte Strukturen abgibt, sind unter anderem PEDF (Ablonczy et al. 2011), VEGF (Ablonczy et al. 2011), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) (Simo et al. 2010), Transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF β) (Simo et al. 2010, Vega et al. 2010), Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) (Penha et al. 2011), Platelet-derived growth factor (PDGF) (Si et al. 2012) und weitere (Simo et al. 2010). Die Funktionen von zwei dieser Faktoren, die eine signifikante Rolle einnehmen, nämlich PEDF und VEGF (Simo et al. 2010), werden im Folgenden genauer erläutert.

PEDF, ein 50 kDa-Glykoprotein und ein Vertreter der Serpin-Familie (Kawaguchi et al. 2010, Noma et al. 2011), wird vom RPE vorrangig apikal sezerniert (Simo et al. 2010), jedoch hat man auch eine basolaterale Anhäufung dieses Faktors in alternden humanen Augen beobachten können (Bhutto et al. 2006, Ablonczy et al. 2011). PEDF stellt einen potenten Inhibitor der Angiogenese dar (Noma et al. 2011), und somit den Gegenspieler zum VEGF (Ablonczy et al. 2011), das eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Blutgefäßen spielt (Shibuya 2013). Durch PEDF wird die Integrität der Barrierefunktion aufrechterhalten (Ablonczy et al. 2011), sowie das Endothel der Choriocapillaris stabilisiert (Simo et al. 2010). Aber PEDF erfüllt auch neuroprotektive Aufgaben, indem es beispielsweise neuronale Zellen vor hypoxie-induzierter Apoptose schützt (Simo et al. 2010).

Ein weiterer Faktor, welcher in gesunden Augen in geringen Mengen vom RPE sezerniert wird, ist das vasoaktive VEGF (Simo et al. 2010). Vornehmlich wird VEGF basolateral sezerniert, wo es mit dem Endothel der Choriocapillaris interagiert (Ford and D'Amore 2012). VEGF spielt eine zentrale Rolle bei der Angiogenese (Shibuya 2013) und stellt einen Modulator der Barrierefunktion, sowohl des RPE, als auch des Endothels retinaler Gefäße dar (Ablonczy et al. 2011).

Die Sekretion von VEGF durch RPE-Zellen erfolgt über neuroendokrine Ca²⁺ Kanäle des L-Typs, wie sie auch in anderen sekretorischen Geweben, wie den Inselzellen des Pankreas vorkommen (Rosenthal et al. 2007, Tang et al. 2012).

Die genannten Faktoren spielen jedoch nicht nur beim Schutz der Photorezeptoren und Erhalt der Integrität der Barrierefunktion, sondern auch bei pathologischen Entzündungen des Auges eine entscheidende Rolle (Luna et al. 1997, Deeg et al. 2007a, Citirik et al. 2012, Nagineni et al. 2012, Bandello et al. 2013).

2.4.7 Das RPE und der Retinalzyklus

Um 1877 machten Boll und seine Kollegen die Entdeckung, dass sich Froschretinae nach Lichteinstrahlung von rot-violett über gelb bis hin zu weiß farblich veränderten (Kiser et al. 2012). Dieser Prozess ist heute als photochemisches Bleichen bekannt und resultiert aus der Photoisomerisation und Hydrolyse der Chromophore des Rhodopsins, nämlich des 11-cis Retinals (Kiser et al. 2012). Noch interessanter wurde die Entdeckung, als die gebleichten Retinae zurück in den Augenhintergrund auf eine dunkle Schicht von Zellen, die heute als RPE bekannt ist, gesetzt wurden und während einer Inkubation im Dunkeln wieder ihre ursprüngliche violette Farbe zurückerlangten (Kiser et al. 2012). Diese Beobachtung erbrachte damals den ersten Hinweis darauf, dass das RPE eine enzymatische Aktivität aufweist, die für die Regeneration der Chromophore verantwortlich sein muss (Kiser et al. 2012). Heute ist bekannt, dass all-trans Retinal aus dem lichtaktivierten Rhodopsin wieder enzymatisch in sein 11-cis Isomer re-isomerisiert wird, was einen Prozess darstellt, an dem eine Reihe membrangebundener Proteine der Photorezeptoren, sowie das RPE maßgeblich beteiligt sind (Kiser et al. 2012).

Die Transduktionskaskade des Lichts wird initialisiert durch die Absorption von Licht durch Rhodopsin, das aus dem Chromophor 11-cis Retinal und dem daran gebundenen Opsin besteht (Simo et al. 2010). 11-cis Retinal verändert durch Absorption von Licht seine Konformation zu all-trans Retinal und aktiviert dadurch das Rhodopsin, das in dieser Form als Metarhodopsin II bezeichnet wird (Choi et al. 2002, Saari 2012). Die aktive Konformation des Rhodopsins wird durch Phosphorylierung wieder aufgehoben, denn nur in inaktivierter Form kann Rhodopsin wieder 11-cis Retinal binden, um nach erneuter Absorption von Licht wieder all-trans Retinal abzugeben (Schadel et al. 2003, Strauss 2005). Jedoch muss dafür das gesamte all-trans Retinal in das 11-cis Retinal re-isomerisiert werden (Kiser et al. 2012). Hierfür wird all-trans Retinal in den Photorezeptoren über eine membrangebundene Retinol Dehydrogenase (RDH), deren Kofaktor das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH) ist, zu all-trans Retinol reduziert (Kiser et al. 2012, Saari 2012). Das all-trans-Retinol verlässt nun die äußeren Bereiche der Photorezeptoren und gelangt, gebunden an IRBP, zu den RPE-Zellen (Kiser et al. 2012, Saari 2012). Um ins Innere der RPE-Zelle zu gelangen wird das

all-trans Retinol nun an das zelluläre Retinol-bindende Protein 1 (CRBP1) gebunden und durch eine Lecithin Retinol Acyltransferase (LRAT) verestert (Kiser et al. 2012, Saari 2012). Die so entstandenen all-trans Retinylester können entweder in RPE-Zellen gespeichert werden, oder sie werden von einer Isomerohydrolase, dem RPE65, in 11-cis Retinol umgewandelt, an CRALBP gebunden (Saari 2012) und anschließend über eine Retinol Dehydrogenase (RDH5) wieder zu 11-cis Retinal oxidiert (Strauss 2005). CRALBP entlässt das 11-cis Retinal am subretinalen Raum, von wo es, gebunden an IRBP, wieder zu den äußeren Segmenten der Photorezeptoren transportiert wird (Saari 2012). In den Photorezeptoren vereint sich das 11-cis Retinal mit dem Opsin, regeneriert das Rhodopsin und steht somit wieder für erneute Phototransduktionskaskaden bereit (Strauss 2005, Saari 2012).

Der Retinalzyklus verdeutlicht nunmehr die Wichtigkeit des RPE für die physiologische Funktionalität des Sehens (Strauss 1995). Zudem zeigt sich hier die Relevanz RPE-spezifischer Proteine, wie CRALBP und RPE65 (Akrami et al. 2011), die wichtige enzymatische Funktionen im Retinalzyklus übernehmen (Jin et al. 2005, Huang et al. 2009).

2.5 Zellkulturmodelle

2.5.1 Primärkultur und Zelllinie

Der Begriff Zellkultur beschreibt die *in vitro* Kultivierung von Zellverbänden, oder auch von einzelnen Zellen, wobei die kultivierten Zellen nicht mehr in einem Gewebe organisiert sind (Schaeffer 1990). Man kann zwei Arten der Zellkultur unterscheiden, die sogenannte Primärkultur und die Zelllinie. Eine Primärkultur ist eine Kultur, die direkt aus Zellen, Geweben oder Organen entsteht und wird solange als solche bezeichnet, bis sie erstmalig und erfolgreich subkultiviert wird (Schaeffer 1990). Ist eine erstmalige erfolgreiche Subkultivierung der Primärkultur gelungen, wird sie ab diesem Zeitpunkt als Zelllinie bezeichnet (Schaeffer 1990). Des Weiteren kann eine Zelllinie als kontinuierliche, wenn ihre Teilungsfähigkeit unbegrenzt ist, oder endliche Zelllinie, wenn ihre Teilungsfähigkeit und somit ihre Lebensdauer begrenzt ist,

vorkommen (Schaeffer 1990). Die kontinuierliche Zelllinie wird auch als immortalisierte Zelllinie bezeichnet und besitzt somit eine unbegrenzte Lebensdauer (Schaeffer 1990). Die Immortalisierung kann entweder spontan auftreten (Limb et al. 2002), oder durch verschiedene biotechnologische Methoden erfolgen, wie zum Beispiel durch Transfektion viraler Antigene (Pan et al. 2012). Die aseptische *in vitro* Kultivierung von Zellen, Geweben und Organen unter definierten physikalischen und chemischen Bedingungen entwickelte sich zu einem wichtigen Werkzeug in der Grundlagen- sowie angewandten Forschung (Thorpe 2012). Voraussetzung für das erfolgreiche Wachstum, den Erhalt und die Expression differenzierter metabolischer Funktionen von Primärkulturen oder Zelllinien *in vitro* sind angemessene Kulturbedingungen, die das physiologische Umfeld der Zellen *in vivo* simulieren (Brunner et al. 2010). Der Vorteil von Zelllinien ist darin zu sehen, dass man als Wissenschaftler Zugang zu einem großen Repertoire verschiedener Zellarten von verschiedenen Spezies hat. Allein die deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, eines der weltgrößten Zentren für biologische Ressourcen, bietet momentan circa 700 humane und tierische Zelllinien an (<http://www.dsmz.de>). Ein weiterer Vorteil von Zellkulturmodellen liegt darin, dass sie einen repräsentativen Ersatz für *in vivo* Studien an Tiermodellen darstellen, die oft mit hohen Kosten, ethischen Bedenken, sowie der häufig fehlenden Übertragbarkeit auf den Menschen verbunden sind (Hahne et al. 2012). Der Nachteil vieler Zelllinien liegt jedoch darin, dass Zellen oft Funktionen *in vivo* aufweisen, die so *in vitro* nicht mehr vorhanden sind, wie beispielsweise die Expression spezifischer Zellmarker (Alge et al. 2003, Aruta et al. 2011).

2.5.2 Zelllinien des RPE

In der Forschung wurden im Laufe der Zeit verschiedene Zelllinien des RPE aus unterschiedlichen Spezies entwickelt. Ein Beispiel für eine RPE-Zelllinie, die durch Immortalisierung mit Hilfe eines Temperatur-sensitiven Simian Virus 40 T-Antigens bei transgenen Mäusen entwickelt wurde ist RPET (Kato et al. 1996). Zelllinien, die aus Ratten-RPE stammen sind zum Beispiel BPEI-1, entstanden durch spontane Immortalisierung der Zellen aus der Evans Ratte (McLaren et al. 1993) und RPE-J,

die durch Infektion des RPE von Long-Evans Ratten mit einem Temperatursensitiven Virus entstanden ist (Nabi et al. 1993). Beispiele für humane RPE Zelllinien sind D407 (Davis et al. 1995), K-1034 (Kigasawa et al. 1994), hTERT-RPE (Rambhatla et al. 2002) und ARPE-19 (Dunn et al. 1996).

ARPE-19 ist die humane RPE-Zelllinie, die momentan am häufigsten in der Forschung verwendet wird (Dunn et al. 1996, Ablonczy et al. 2011). Das RPE, aus dem ARPE-19 entwickelt wurde, stammte von einem 19 Jahre alten männlichen Spender in den USA (Dunn et al. 1996). Durch mehrmalige selektive Trypsinierung, die zum Ziel hatte, nicht vollständig adhärente und fibroblastische Zellen zu entfernen, konnte eine Reinkultur von RPE Zellen gewonnen werden (Dunn et al. 1996). ARPE-19 ist wie die meisten humanen RPE-Zelllinien eine spontan entstandene RPE-Zelllinie, die eine uniforme epitheliale Population mit starkem Teilungspotenzial darstellt und eine normale diploide Karyologie besitzt, im Vergleich zu D407, die eine fast vollkommene Trisomie aufweist (Dunn et al. 1996). Spezifische Zellmarker, wie das CRALBP und RPE65 sind bei dieser Zelllinie nachweisbar (Dunn et al. 1996, Ablonczy et al. 2011), obwohl der Verlust dieser spezifischen Marker bei kultivierten Zellen nachgewiesen wurde (Alge et al. 2003). Zudem konnte bis dahin noch bei keiner anderen RPE-Zelllinie RPE65 als RPE-Zellmarker nachgewiesen werden (Dunn et al. 1996). ARPE-19 ist in der Lage eine epitheliale Schicht auf porösen Filtern auszubilden und kann so für *in vitro* Versuche, die mit der Barrierefunktion des RPE in Verbindung stehen, verwendet werden (Dunn et al. 1996).

Jedoch folgten im Laufe der Jahre Versuche mit fötalen humanen RPE-Zellen (fhRPE), die mit ARPE-19 verglichen wurden (Ablonczy et al. 2011, Kannan et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass CRALBP und RPE65 bei fhRPE, deutlich mehr exprimiert werden als bei ARPE-19, was darauf hindeutet, dass fhRPE nativen differenzierten RPE-Zellen mehr entspricht als ARPE-19 (Ablonczy et al. 2011, Aruta et al. 2011). Außerdem wurden Unterschiede in der Expression interzellulärer Tight-Junctions festgestellt und höhere transepitheliale Widerstände auf porösen Filtern bei fhRPE gemessen, was auf eine bessere Barrierefunktion bei fhRPE hindeutet (Ablonczy et al. 2011). Obwohl solche vergleichenden Studien die Nachteile bei der Verwendung bestimmter Zelllinien, wie ARPE-19 gegenüber primären RPE-Zellen wie fhRPE aufzeigen (Ablonczy et al. 2011), bieten Zelllinien doch viele Vorteile für

biochemische und molekularbiologische Studien, weil sie die Erforschung einer Reinkultur unter experimentellen Bedingungen zulassen und zudem einen grenzenlosen und immer gleichwertigen Vorrat an Zellen für *in vitro* Experimente darstellen (Alge et al. 2006).

2.6 Proteomik

Das Proteom bezeichnet eine unter bestimmten Umständen vorherrschende Zusammenstellung exprimierter Proteine einer bestimmten Zelle oder eines Gewebes, zu einer bestimmten Zeit (Rotilio et al. 2012). Anders als das Genom, welches in allen somatischen Zellen eines jeden Organismus gleichbleibend ist, stellt das Proteom ein dynamisches Gebilde dar, welches sich nicht nur innerhalb verschiedener Zellarten unterscheidet, sondern sich mit dem physiologischen Zustand der Zelle verändert (Alge et al. 2003). Naturwissenschaftliche Teilgebiete, welche die Endung „omik“ tragen, bezeichnen die Erforschung entsprechender biologischer Systeme (Grassmann et al. 2012). Folglich bezeichnet der Begriff Proteomik die Erforschung der Zusammenstellung von Proteinen - des Proteoms (Barbosa et al. 2012).

Proteomik kann weiter unterteilt werden in strukturelle, funktionelle, sowie differenzielle Proteomik (Grassmann et al. 2012). Besonders der differenziellen Proteomik, dem Vergleich von Proteinexpressionen bestimmter Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen, wird eine überaus wichtige Rolle bei der Erforschung von Pathogenesemechanismen zugesprochen (Monteoliva and Albar 2004).

Will man bei einer Erkrankung wie der ERU die Unterschiede zwischen gesunden und kranken Augen von Tieren erforschen, kann man Probenmaterial eines erkrankten Tieres mit Probenmaterial einer gesunden Kontrolle hinsichtlich seiner Proteinexpression vergleichen. Folglich kann man sich die differenzielle Proteomik zu Nutze machen, da das Proteom dynamisch ist und sich krankheitsspezifisch verändern kann. Methoden, die eine differenzielle Proteomanalyse ermöglichen sind beispielsweise die zweidimensionale Polyacrylgel-Elektrophorese (2D-PAGE), die differenzielle zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-DIGE) und die Tandem-Massenspektrometrie mit vorangestellter Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS).

Bei 2D-PAGE werden Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes in der ersten Dimension, sowie ihres Molekulargewichts im Gel in der zweiten Dimension aufgetrennt und anschließend durch Anfärben mit Coomassie-Blau oder durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Rodriguez-Suarez and Whetton 2013). Ein weiter entwickeltes Verfahren dazu bietet 2D-DIGE, bei dem die Proteingemische fluoreszenzmarkiert werden und im Vergleich zu 2D-PAGE in nur einem Gel aufgetrennt werden, was den Vorteil bietet, dass nur ein Gel verwendet wird und somit technische Abweichungen vermieden werden (Langley et al. 2013). Aus den entweder durch 2D-PAGE oder 2D-DIGE sichtbar gemachten Proteinen werden die interessanten Proteine nachfolgend ausgeschnitten, entfärbt, und nach enzymatischem Verdau massenspektrometrisch identifiziert (Rotilio et al. 2012). Der Nachteil dieser beiden Methoden liegt jedoch darin, dass vor allem schwer lösliche hydrophobe Membranproteine und wenig abundante Proteine oft nicht entdeckt werden (Rodriguez-Suarez and Whetton 2013). So hat sich in den letzten Jahren die Tendenz hin zu nicht Gel-basierten massenspektrometrischen Nachweismethoden verschoben (Rodriguez-Suarez and Whetton 2013). LC-MS/MS stellt solch eine nicht Gel-basierte Methode dar, die eine große Genauigkeit bei der Analyse komplexer Proteingemische ermöglicht und über eine entsprechende Datenverarbeitungssoftware sogar eine zeitgleiche Analyse verschiedener Peptide aus vielen verschiedenen Experimenten möglich macht (Rotilio et al. 2012). Zudem hat sich die Sensitivität massenspektrometrischer Analysen in der Proteinanalytik in den letzten Jahren immer mehr verbessert (Doherty and Whitfield 2011). So ist die Identifikationsrate von Proteinen in den letzten Jahren immer mehr angestiegen – hat man beispielsweise 2006 nur 16 Proteine im Hühnereiweiß identifizieren können (Guerin-Dubiard et al. 2006), waren es 2007 bereits 78 (Mann 2007) und schon 158 im Jahr 2011 (Mann and Mann 2011). Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf Messung des Masse-zu-Ladung Verhältnisses (m/z) von ionisierten Peptiden. Proteine werden enzymatisch in Peptidbruchstücke verdaut und durch Elektrospray ionisiert (Langley et al. 2013). Die ionisierten Peptidstücke werden anschließend über ein erzeugtes Potential zwischen zwei Elektroden in einer Vakuumröhre beschleunigt (Barbosa et al. 2012). Die dabei erreichte Geschwindigkeit wird von einem Detektor erfasst und das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Peptidbruchstücke ermittelt. Das endgültige Ergebnis ergibt sich aus dem Verhältnis von m/z zu Ionenintensität der

Peptidstücke und wird als MS-Spektrum bezeichnet (Barbosa et al. 2012). Die generierten Daten können in einer Datenbank wie MASCOT oder SEQUEST abgeglichen und das gesuchte Protein identifiziert werden (Barbosa et al. 2012). LC-MS/MS stellt heutzutage den Goldstandard bei der Proteinanalytik dar (Langley et al. 2013).

2.7 Membranproteine

Membranen stellen überaus wichtige Bestandteile von Zellen und Zellorganellen dar, da sie über Membranen mit ihrer Außenwelt in Kontakt stehen (Whitelegge 2013). Fast ein Drittel der Masse der gesamten Lipiddoppelmembranen aller Zellen besteht aus Membranproteinen, die entweder innerhalb als integrale Membranproteine oder außen an ihren Oberflächen lokalisiert sind (Whitelegge 2013). Somit stellen Membranproteine fast 30% aller kodierten Proteine des bereits sequenzierten Genoms dar (Souda et al. 2011). Aufgrund der Tatsache, dass viele Membranproteine auf Zelloberflächen exprimiert werden, dienen sie sehr vielen Medikamenten als Angriffsziel (Fagerberg et al. 2010). Abhängig von ihrer Lage haben Membranproteine viele wichtige Aufgaben zu erfüllen (Tan et al. 2008). Zum Beispiel fungieren Membranproteine als Adhäsionsmoleküle, die interzelluläre Verbindungen und somit die Kommunikation zwischen Zellen aufrechterhalten (Tan et al. 2008). Membranproteine als Rezeptoren auf Zelloberflächen spielen bei Signaltransduktionskaskaden eine entscheidende Rolle (Jafurulla and Chattopadhyay 2013). Außerdem erfüllen viele Membranproteine Transportfunktionen, indem sie entweder als Kanalproteine, wie zum Beispiel Kaliumkanäle (Hibino et al. 2010) oder aktive Transportproteine, wie die Na^+/K^+ ATPase (Rajasekaran et al. 2003), exprimiert werden und transportieren somit verschiedene Moleküle und chemische Stoffe zwischen den Kompartimenten (Tan et al. 2008, Fagerberg et al. 2010). Des Weiteren weisen viele Membranproteine auch enzymatische Funktionen auf. Beispielhaft sei in diesem Zusammenhang RPE65 als enzymatisch wirksames Membranprotein zu nennen (Tsilou et al. 1997).

Verschiedene Methoden zur Anreicherung von Membranproteinen (Weekes et al. 2010) sowie die Entwicklung nicht Gel-basierter Methoden in der Proteinanalytik

(Rodriguez-Suarez and Whetton 2013) erleichtern heutzutage die Analyse von Membranproteinen, die in der Vergangenheit aufgrund ihrer hydrophoben Natur und der niedrigen Abundanz nur sehr schlecht detektierbar waren (Barrera and Robinson 2011).

3 PUBLIKATION

Titel

„Profound Re-Organization of Cell Surface Proteome in Equine Retinal Pigment Epithelial Cells in Response to *In Vitro* Culturing”

Autoren

Christoph M. Szober, Stefanie M. Hauck, Kerstin N. Euler, Kristina J. H. Fröhlich, Claudia Alge-Priglinger, Marius Ueffing, Cornelia A. Deeg

Journal

International Journal of Molecular Sciences

Status

Publiziert.

Int. J. Mol. Sci. **2012**, *13*, 14053-14072; doi:10.3390/ijms131114053

<http://www.mdpi.com/1422-0067/13/11/14053>

Int. J. Mol. Sci. **2012**, *13*, 14053-14072; doi:10.3390/ijms131114053

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences

ISSN 1422-0067

www.mdpi.com/journal/ijms

Article

Profound Re-Organization of Cell Surface Proteome in Equine Retinal Pigment Epithelial Cells in Response to *In Vitro* Culturing

Christoph M. Szober¹, **Stefanie M. Hauck**², **Kerstin N. Euler**¹, **Kristina J. H. Fröhlich**¹,
Claudia Alge-Priglinger³, **Marius Ueffing**^{2,4} and **Cornelia A. Deeg**^{1,*}

¹ Institute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-University Munich, D-80539 Munich, Germany; E-Mails: christoph.szober@tiph.vetmed.uni-muenchen.de (C.M.S.); kerstin.euler@tiph.vetmed.uni-muenchen.de (K.N.E.); k.froehlich@tiph.vetmed.uni-muenchen.de (K.J.H.F.)

² Research Unit Protein Science, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, D-85764 Neuherberg, Germany; E-Mails: hauck@helmholtz-muenchen.de (S.M.H.); marius.ueffing@helmholtz-muenchen.de (M.U.)

³ Department of Ophthalmology, Ludwig-Maximilians-University, Mathildenstrasse 8, D-80336 Munich, Germany; E-Mail: claudia.alge-priglinger@med.uni-muenchen.de

⁴ Centre of Ophthalmology, Institute for Ophthalmic Research, University of Tübingen, Röntgenweg 11, D-72076 Tübingen, Germany

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de; Tel.: +49-89-21801630; Fax: +49-89-21802554.

Received: 11 September 2012; in revised form: 23 October 2012 / Accepted: 25 October 2012 /

Published: 31 October 2012

Abstract: The purpose of this study was to characterize the cell surface proteome of native compared to cultured equine retinal pigment epithelium (RPE) cells. The RPE plays an essential role in visual function and represents the outer blood-retinal barrier. We are investigating immunopathomechanisms of equine recurrent uveitis, an autoimmune inflammatory disease in horses leading to breakdown of the outer blood-retinal barrier and influx of autoreactive T-cells into affected horses' vitrei. Cell surface proteins of native and cultured RPE cells from eye-healthy horses were captured by biotinylation, analyzed by high resolution mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC MS/MS), and the most interesting candidates were validated by PCR, immunoblotting and immunocytochemistry. A total of 112 proteins were identified, of which 84% were cell

surface membrane proteins. Twenty-three of these proteins were concurrently expressed by both cell states, 28 proteins exclusively by native RPE cells. Among the latter were two RPE markers with highly specialized RPE functions: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) and retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa (RPE65). Furthermore, 61 proteins were only expressed by cultured RPE cells and absent in native cells. As we believe that initiating events, leading to the breakdown of the outer blood-retinal barrier, take place at the cell surface of RPE cells as a particularly exposed barrier structure, this differential characterization of cell surface proteomes of native and cultured equine RPE cells is a prerequisite for future studies.

Keywords: equine recurrent uveitis; membrane protein; outer blood-retinal barrier; retinal pigment epithelium cells; cell line; proteomics

1. Introduction

Protein expression analysis with mass spectrometry has become an important tool to understand participating proteins in physiological networks and on cellular levels [1]. The proteome is the set of expressed proteins in a given type of cell at a given time under defined conditions [2]. Analysis technologies continually improved in the field of proteomics in the last years, especially regarding sensitivity of mass spectrometric analysis [3]. This enables increasingly better investigations of complex and widely dynamic protein concentrations [3]. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) allowed resolution of thousands of proteins [4], but it also has major disadvantages, mainly inadequate resolution of cell surface membrane proteins. Recently, several different approaches were applied to enhance cell surface membrane protein identification in tissues through variations in sample preparation [5,6]. Further, mass spectrometry is rapidly advancing, and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has emerged as a highly precise and sensitive high-throughput technique for protein identification and characterization and facilitates discovery of proteins [3,6].

We are interested in immunopathomechanisms of equine recurrent uveitis (ERU), a spontaneous, organ-specific autoimmune disease characterized through remitting-relapsing attacks of leukocytes to the retina [1]. Earlier examinations of immune and target tissue proteomes revealed several interesting findings in this model disease for human autoimmune uveitis, e.g., identification of a novel autoantigen with importance for ERU and correspondent human disease [7,8]. Another surprising finding was the involvement of regulated granulocytes in intraocular inflammation of this T-cell mediated disease [4]. Moreover, differential proteome analyses of changes in targeted retina revealed a decisive role for retinal Mueller glial cells in pathogenesis [1,9,10]. A key event of uveitis is migration of immune cells through the blood-retinal barrier, because the inner eye is physiologically devoid of leukocytes. There are two different structures of blood-retinal barriers in the eye. Inner blood-retinal barrier is formed by two beds of capillary endothelia [11]. Outer blood-retinal barrier lies on the outer surface of the photoreceptor layer and closely resembles the ventricular portion of the blood-brain barrier [11]. Horses possess a widely avascular retina [12], and activated cells pass outer blood-retinal

barrier in ERU [13]. Outer blood-retinal barrier is formed and maintained by retinal pigment epithelium (RPE) cells [11]. RPE cells use different mechanisms to establish important barrier function, including membrane pumps, transporters and different channels [11]. Initiating events of blood-retinal barrier breakdown are expected to take place at the cell surface as a particularly exposed barrier structure. So far, there is only very limited knowledge about the cell surface membrane proteome of retinal pigment epithelium cells, and therefore, the goal of this study was the identification of physiological RPE cell surface protein expression. Since studies for RPE cell functions are mainly performed with RPE cell lines [14], we additionally examined changes in RPE cell surface protein expression induced through cultivation of cells to evaluate modifications of RPE cells after passaging.

2. Results

2.1. Cell Surface Protein Expression of Physiological RPE Cells

A total of 112 proteins were identified with two or more peptides on the cell surfaces of RPE cells derived from healthy eyes (Table 1). Of these identified proteins, 84% were membrane proteins according to GO terminology (Table 1, cellular localization and Figure 1). Major differences were seen in proteins with GO for transport dominated in native cells (Figure 1A, bright blue segment) whereas proteins assigned with cell adhesion (Figure 1, dark green) and cell communication (Figure 1, grey) were upregulated in P4 cells (Figure 1B) in comparison to native RPE cells (Figure 1A). The relation between the last two GO terms, cell adhesion and cell communication, to all GO for biological process remained the same (Figure 1A,B, dark green and grey segments). In detail, 23 proteins were equally detectable in both examined states, native and passage-4 cells (20.5% of all 112 identified proteins), (Table 1, proteins 1–23). Beta-actin was among these unchanged proteins under both conditions, as seen in PCR and Western blot analysis, indicating equal protein loading for mass spectrometry (Table 1, protein 3; Figures 2 and 3). Besides some keratins (Table 1; proteins 7–12), an integrin (Table 1; protein 4) and six ion channel proteins (Table 1; proteins 15–17, 21–23) were stably expressed in native and cultured RPE cells.

Table 1. Cell surface proteins expressed by RPE cells of horses. Proteins listed were identified by LC MS/MS with a probability score that is significant with $p < 0.05$ if the confidence score was >30 at a significance threshold for the Mascot result of $p \leq 0.01$. N = native RPE cells; P4 = passage-4 RPE cells; C = cytoplasmatic; M = membrane associated; E = extracellular.

#	Identified protein	Accession number	MW (kDa)	Occurrence		Unique peptide count		Sequence coverage (%)		Cellular localization		
				N	P4	N	P4	N	P4	C	M	E
1	ATP-binding cassette, sub-family C, member 1	ENSECAP00000005390	164	x	x	9	17	9	17			x
2	Basigin	ENSECAP00000010130	24	x	x	4	3	28	28			x
3	Beta-actin	ENSECAP00000013637	41	x	x	2	3	8	23	x		
4	CD29	ENSECAP00000020201	88	x	x	6	21	11	34			x

Table 1. Cont.

#	Identified protein	Accession number	MW (kDa)	Occurrence		Unique peptide count		Sequence coverage (%)		Cellular localization		
				N	P4	N	P4	N	P4	C	M	E
5	CD44	ENSECAP00000008636	77	x	x	2	7	4	14	x	x	
6	CD90	ENSECAP00000007841	18	x	x	3	4	24	30		x	
7	Cytokeratin 1	ENSECAP00000019935	66	x	x	3	3	6	7	x	x	
8	Cytokeratin 2	ENSECAP00000015380	61	x	x	3	3	9	9	x		
9	Cytokeratin 16	ENSECAP00000004544	51	x	x	6	4	19	13	x		
10	Cytokeratin 10	ENSECAP00000018005	43	x	x	14	14	28	30	x		
11	Cytokeratin 5	ENSECAP00000018010	62	x	x	11	8	17	14	x	x	
12	Cytokeratin 6C	ENSECAP00000011363	60	x	x	2	3	12	13	x		
13	Desmoplakin	ENSECAP00000012688	168	x	x	4	4	4	5		x	
14	Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1	ENSECAP00000011146	96	x	x	5	15	10	28		x	x
15	Na(+)/K(+) ATPase alpha-1 subunit	ENSECAP00000022397	113	x	x	2	3	13	12		x	
16	Na(+)/K(+) ATPase alpha-3 subunit	ENSECAP00000022127	113	x	x	10	5	15	8		x	
17	Na(+)/K(+) ATPase beta-1 subunit	ENSECAP00000015566	35	x	x	3	3	14	14		x	
18	Neuroplastin	ENSECAP00000006428	42	x	x	2	5	6	16		x	
19	Plexin B2	ENSECAP00000017324	183	x	x	3	10	3	11	x	x	
20	Pyruvate Carboxylase	ENSECAP00000022492	130	x	x	5	13	7	18		x	
21	Solute carrier family 2, member 1	ENSECAP00000000404	54	x	x	7	5	12	9	x	x	
22	Solute carrier family 3, member 2	ENSECAP00000007939	62	x	x	10	10	28	30	x	x	
23	Solute carrier family 44, member 2	ENSECAP00000009162	79	x	x	2	3	3	8		x	
24	Carbonic anhydrase 14	ENSECAP00000002354	31	x		4	0	25	0		x	
25	CD107a	ENSECAP00000015399	44	x		2	1	8	4		x	
26	CD107b	ENSECAP00000016219	46	x		2	1	5	2		x	
27	CD156c	ENSECAP00000006414	82	x		2	0	6	0	x	x	
28	CD36L2	ENSECAP00000022283	50	x		2	0	7	0		x	
29	Cellular retinaldehyde-binding protein	ENSECAP00000002273	36	x		3	0	12	0	x		
30	Chondroitin sulfate proteoglycan 5	ENSECAP00000020923	54	x		2	0	9	0		x	
31	Cytokeratin 17	ENSECAP00000014186	48	x		3	1	14	7	x	x	
32	Cytokeratin 75	ENSECAP00000008235	59	x		2	0	12	7	x		
33	Cytokeratin 77	ENSECAP00000006788	63	x		2	1	8	5	x		
34	Glycoprotein M6A	ENSECAP00000014508	31	x		5	0	18	0		x	
35	Heat shock protein 90 kDa beta member 1	ENSECAP00000009012	92	x		2	1	4	2	x	x	
36	Inward rectifier K(+) channel Kir7.1	ENSECAP00000005853	41	x		3	0	9	0		x	
37	Retinol dehydrogenase 5	ENSECAP00000017236	35	x		3	0	15	0		x	
38	RPE65	ENSECAP00000008347	60	x		3	0	11	0		x	
39	Solute carrier family 1, member 4	ENSECAP00000009506	55	x		3	1	8	4	x	x	
40	Solute carrier family 12, member 2	ENSECAP00000013091	119	x		4	1	5	2	x	x	
41	Solute carrier family 13, member 3	ENSECAP00000008631	63	x		3	0	7	0		x	
42	Solute carrier family 16, member 1	ENSECAP00000019149	54	x		3	0	7	0		x	
43	Solute carrier family 4, member 7	ENSECAP00000004107	137	x		2	0	3	0		x	
44	Solute carrier family 6, member 13	ENSECAP00000012525	68	x		4	0	9	0		x	
45	Solute carrier family 6, member 9	ENSECAP00000003659	71	x		3	0	7	0		x	
46	Solute carrier family 6, member 6	ENSECAP00000011341	70	x		2	0	5	0		x	
47	Solute carrier family 6, member 20	ENSECAP00000018972	66	x		3	0	7	0		x	

Table 1. Cont.

#	Identified protein	Accession number	MW (kDa)	Occurrence		Unique peptide count		Sequence coverage (%)		Cellular localization		
				N	P4	N	P4	N	P4	C	M	E
48	Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	ENSECAP00000015472	74	x		2	0	3	0		x	
49	Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	ENSECAP00000010749	76	x		4	0	9	0		x	
50	Thioredoxin domain containing 5	ENSECAP00000000114	36	x		2	0	12	0	x		
51	Transmembrane protein 27	ENSECAP00000017054	25	x		3	0	18	0		x	
52	Actin, alpha 1	ENSECAP00000000126	42		x	0	5	0	18	x		
53	Adlican	ENSECAP00000015067	313		x	0	5	0	3			x
54	Anoctamin 6	ENSECAP00000010736	105		x	0	3	0	7		x	
55	Cadherin 13	ENSECAP00000018588	76		x	0	7	0	15		x	
56	Cadherin 2	ENSECAP00000008264	91		x	0	8	0	21		x	
57	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	ENSECAP00000008740	104		x	0	5	0	8		x	
58	Catenin, gamma	ENSECAP00000018374	82		x	1	2	2	3	x	x	
59	CD105	ENSECAP00000018048	70		x	0	4	0	11		x	x
60	CD109	ENSECAP00000020689	159		x	0	7	0	9			x
61	CD13	ENSECAP00000007954	110		x	0	2	0	3		x	
62	CD140b	ENSECAP00000022400	121		x	1	11	2	17		x	
63	CD142	ENSECAP00000020955	32		x	1	2	6	10		x	x
64	CD280	ENSECAP00000010799	162		x	0	9	0	9		x	
65	CD315	ENSECAP00000014826	98		x	1	3	2	5		x	
66	CD318	ENSECAP00000022716	93		x	1	2	2	4		x	
67	CD362	ENSECAP00000006433	22		x	0	2	0	12		x	
68	CD46	ENSECAP00000007802	32		x	0	2	0	10		x	
69	CD49a	ENSECAP00000015387	129		x	0	9	0	13		x	
70	CD49c	ENSECAP00000013928	119		x	1	9	1	12		x	
71	CD49d	ENSECAP00000009001	114		x	0	5	0	7		x	
72	CD49e	ENSECAP00000022617	115		x	0	7	0	11		x	
73	CD51	ENSECAP00000020829	113		x	0	15	0	21		x	
74	CD54	ENSECAP00000011996	57		x	0	2	0	0		x	x
75	CD56	ENSECAP00000017648	93		x	0	3	0	6		x	
76	CD61	ENSECAP00000016485	84		x	0	3	0	8		x	
77	CD71	ENSECAP00000021947	86		x	0	2	0	4		x	x
78	CD73	ENSECAP00000007576	51		x	0	8	0	28	x	x	
79	CD91	ENSECAP00000010929	504		x	0	44	0	16		x	
80	Cell adhesion molecule 1	ENSECAP00000013033	47		x	0	2	0	12		x	
81	Dystroglycan 1	ENSECAP00000007588	97		x	0	3	0	6	x	x	
82	Endothelin converting enzyme 1	ENSECAP00000014392	86		x	0	2	0	5	x	x	
83	EPH receptor A2	ENSECAP00000006952	108		x	0	4	0	5		x	
84	Fibroblast activation protein, alpha	ENSECAP00000010111	88		x	0	4	0	8		x	
85	Fibronectin 1	ENSECAP00000005228	262		x	0	35	0	26		x	x
86	Fibulin 1	ENSECAP00000016104	75		x	0	6	0	16		x	X
87	Fibulin 2	ENSECAP00000007213	125		x	1	17	3	24			x
88	Folate hydrolase 1	ENSECAP00000020544	85		x	0	2	0	5	x	x	

Table 1. Cont.

#	Identified protein	Accession number	MW (kDa)	Occurrence		Unique peptide count		Sequence coverage (%)		Cellular localization		
				N	P4	N	P4	N	P4	C	M	E
89	Frizzled family receptor 1	ENSECAP0000000907	60	x		0	2	0	4		x	
90	Frizzled family receptor 2	ENSECAP00000015209	61	x		0	2	0	4	x	x	
91	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	ENSECAP00000002466	46	x		0	3	0	11			x
92	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 3	ENSECAP00000022543	60	x		0	5	0	14		x	
93	Integrin, alpha 11	ENSECAP00000020852	133	x		0	7	0	12		x	
94	Integrin, alpha 8	ENSECAP00000011756	117	x		0	8	0	16		x	
95	Integrin, beta 5	ENSECAP00000006461	85	x		1	11	3	22		x	
96	Latent transforming growth factor beta binding protein 2	ENSECAP00000016809	196	x		0	2	0	2			x
97	MHC I	ENSECAP00000008517	40	x		0	2	0	7		x	
98	Na, K-ATPase beta-3 polypeptide	ENSECAP00000017575	27	x		0	2	0	15	x	x	
99	Natriuretic peptide receptor C	ENSECAP00000017782	60	x		0	4	0	12		x	
100	Neuropilin 1	ENSECAP00000018748	103	x		0	8	0	15	x	x	
101	Neuropilin 2	ENSECAP00000015439	105	x		0	2	0	4		x	
102	NOTCH2	ENSECAP00000013532	245	x		0	2	0	2		x	
103	Plexin domain containing 2	ENSECAP00000015262	44	x		0	4	0	13		x	
104	Propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide	ENSECAP00000016512	56	x		0	4	0	13	x		
105	Protein tyrosine kinase 7	ENSECAP00000009553	98	x		0	11	0	21		x	
106	Solute carrier family 1, member 5	ENSECAP00000009592	56	x		0	3	0	6		x	
107	Sushi domain containing 5	ENSECAP00000005951	67	x		0	4	0	11		x	
108	Thrombospondin 1	ENSECAP00000007423	130	x		0	27	0	37	x	x	
109	Transmembrane protein 2	ENSECAP00000019147	154	x		0	3	0	3		x	
110	Tubulin, alpha 1c	ENSECAP00000007419	50	x		0	2	0	7	x		
111	Vasorin	ENSECAP00000002864	72	x		0	3	0	5		x	
112	Versican	ENSECAP00000017347	94	x		0	2	0	4			x

Figure 1. Classification of RPE cell surface proteins based on GO for biological process of native RPE cell proteins (A) and passage-4 RPE cell proteins (B). Numbers in percentages (%) correspond to the number of GO terms assigned for respective preparation. GO terms defined as others include those with an occurrence of <1.1%.

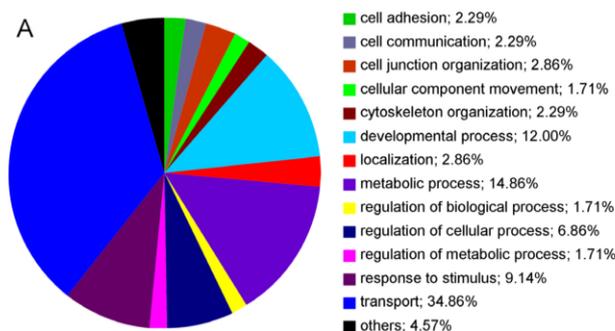
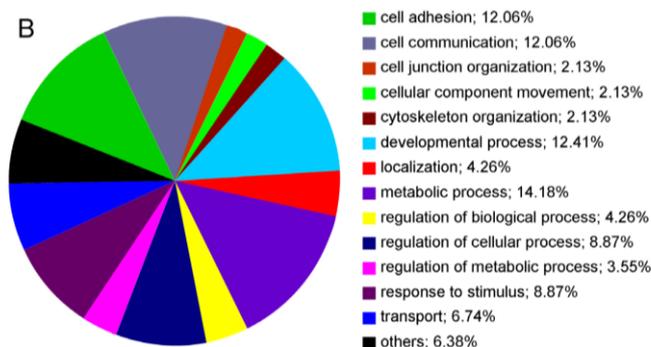


Figure 1. Cont.



2.2. Cell Surface Proteomes of Native and Cultured RPE Cells Differ Considerably

Interestingly, 28 proteins were only expressed in native RPE cells (25% of all 112 identified proteins), (Table 1; proteins 24–51) and they were not detectable in cultured RPE cells (Table 1). Among these were cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) (Table 1, protein 29), retinol dehydrogenase 5 (RDH5) (Table 1, protein 37) and retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa (RPE65) (Table 1, protein 38), all proteins known to be expressed in RPE cells [15,16]. RPE65 is a RPE cell specific protein, which is only expressed in original RPE cells [17]. In contrast, 61 proteins were exclusively expressed in RPE cells of passage-4 (54.5% of all 112 identified proteins), for example CD49c, fibronectin and thrombospondin 1 (Table 1, proteins 70, 85 and 108). We picked CRALBP, RPE65, fibronectin and CD49c and validated these differentially regulated proteins on transcriptomic level by PCR (Figure 2), on protein level by Western blot (Figure 3) and by immunocytochemistry (Figure 4). According to the results from LC MS/MS, CRALBP and RPE65 were expressed in native RPE cells but not in passage-4 cells (Figures 2–4).

Figure 2. Gel electrophoresis of PCR products of native (N) and passage-4 (P4) equine RPE cell cDNA on a 2% agarose gel. Beta-actin is equally expressed by both cell states. Native RPE cells express CRALBP and RPE65, whereas no signal could be detected in passage-4 RPE. Fibronectin and CD49c are expressed distinctly by passage-4 RPE cells, while only a faint signal can be seen in native cells.

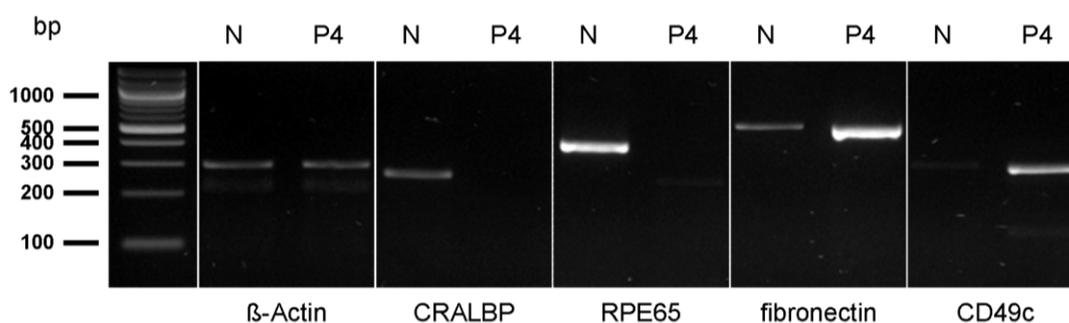


Figure 3. Western blot of a 10% 1D SDS-gel with lysates from native and cultured equine RPE passage-4 cells. N = native; P4 = passage-4. 5 μ g protein of each lysate were loaded per lane. Boxes indicate the expected region for a signal regarding the molecular size of the respective protein.

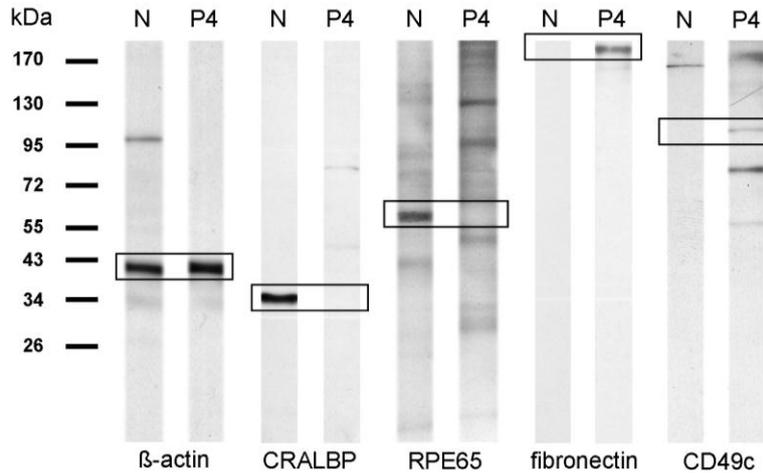
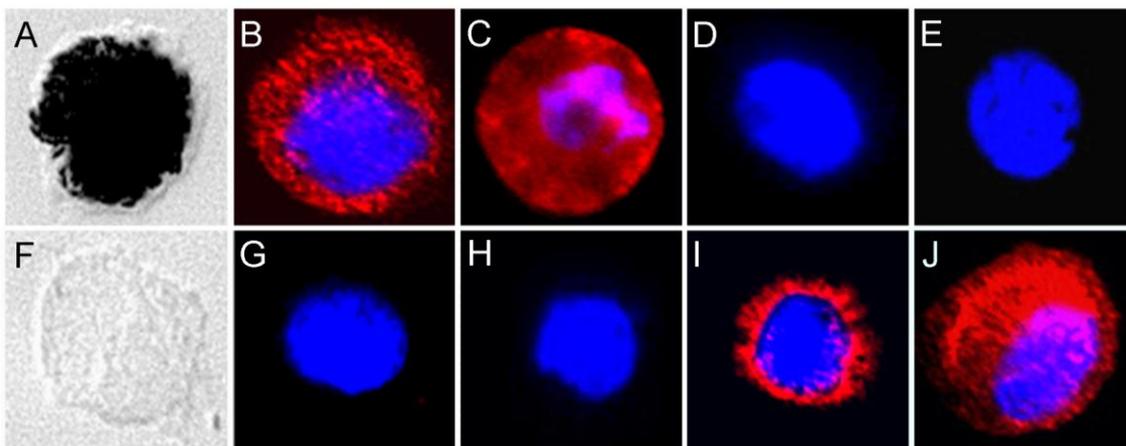


Figure 4. Immunocytochemistry of equine RPE cells. Upper panel (A–E) shows native equine RPE cells. Lower panel (F–J) shows cultured equine RPE cells of passage-4. Native cells show positive immunoreactivity for CRALBP (B) and RPE65 (C). Native cells show no immunoreactivity for fibronectin (D) and CD49c (E). In passage-4 RPE cells, CRALBP (G) and RPE65 (H) do not show immunoreactivity, other than fibronectin (I) and CD49c (J), which is found positive in passage-4 cells. Nuclei were stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). A and F show Nomarski imaging of the respective RPE cells, native (A) and passage-4 (F).



By immunocytochemistry, a cytoplasmatic punctuate expression pattern could be shown for CRALBP, whereas RPE65 showed positive immunoreactivity throughout the cytoplasm and parts of the membrane in native RPE cells. Fibronectin and CD49c were present in passage-4 RPE cells and absent in native cells, which could be shown by immunoblotting and immunocytochemistry

(Figures 3 and 4). Immunocytochemistry of passage-4 cells showed a perinuclear staining for fibronectin and a punctuate staining for CD49c. On mRNA level, a distinct signal in passage-4 RPE cells and only a faint signal in native cells for fibronectin and CD49c could be demonstrated. Beta-actin was abundant in both states, native and passage-4 (Figures 2 and 3).

3. Discussion

The RPE forms the outer blood-retinal barrier and plays an essential role in visual function [18]. Since it is located between the choroids and the neurosensory retina, it has to fulfill important functions, like absorption of light, reisomerization of all-trans retinal into 11-cis retinal, protection against photooxidation, epithelial transport of ions, nutrients and fluids, phagocytosis of photoreceptor outer segments, secretion of essential factors for the integrity of neighboring tissues and supporting the immune privilege of the inner eye [19]. As one characteristic of ERU is the breakdown of the outer blood-retinal barrier, our aim is to elucidate the pathomechanisms that are involved in this breakdown. Therefore, performing functional studies on equine RPE cells will be necessary to understand their role in ERU [20]. We set our focus on cell surface membrane proteins in this study, as we expect them to be targets for initiating events in the breakdown of the outer blood-retinal barrier in eyes of ERU diseased horses. In order to detect differentially regulated cell surface membrane proteins in the eyes of affected horses, it is a prerequisite to identify the cell surface membrane proteome of equine RPE cells in the physiological state. We compared native equine RPE cells with passage-4 cells to determine if there were any changes in this proteome due to cultivation and dedifferentiation. Changes in the whole proteome without specific focus on cell surface membrane proteins in cultured human RPE cells compared to native human RPE cells were described previously [14]. To our knowledge, we are the first to describe the cell surface membrane proteome of native and cultured equine RPE.

A total of 112 proteins were identified by LC MS/MS, of which 84% were cell membrane proteins (Table 1). Twenty-three proteins were concurrently expressed in both, native and passage-4 RPE cells which equals 20.5% of all 112 identified proteins (Table 1, proteins 1–23). Whereas 28 proteins (25% of all 112 identified proteins) were exclusively expressed in native cells (Table 1, proteins 24–51), 61 proteins (54.5% of all 112 identified proteins) were expressed only in passage-4 cells (Table 1, proteins 52–112), indicating a profound re-organization of the cell surface proteome in cultured equine RPE cells.

As expected, beta-actin, an ubiquitously expressed housekeeping protein [21], was equally expressed in both examined states (Table 1, protein 3). Among the equally expressed proteins, six cytokeratins were present, which are intermediate filament proteins (Table 1, proteins 7–12). Desmoplakin, a desmosomal protein which mediates intercellular adhesion in human RPE cells [22], was also equally expressed in both states of equine RPE cells (Table 1, protein 13), as well as basigin (Table 1, protein 2), which plays a key role in extracellular matrix (ECM), remodeling [23] and neuroplastin (Table 1, protein 18), which belongs to the same protein family [24]. Basigin was already described as being expressed by human RPE *in situ* and by a human RPE cell line, namely ARPE-19 [25]. Further, four different types of Na⁺/K⁺ ATPases were identified, which are usually localized apically in RPE cells [26]. Three of them were expressed in both states (Table 1, proteins 15–17), whereas one of them was only present in passage-4 RPE cells (Table 1, protein 98).

Among the 28 proteins exclusively expressed in native equine RPE cells, there were three cytokeratins (Table 1, proteins 31–33) and few ion-channel proteins, namely Kir7.1; solute carrier family 1, member 4; solute carrier family 12, member 2; solute carrier family 13, member 3; solute carrier family 16, member 1; solute carrier family 4, member 7; solute carrier family 6, members 6, 9, 13, 20; and solute carrier organic anion transporter family, member 1A2 and member 1B3 (Table 1, proteins 39–49). Further, we identified two RPE cell markers, CRALBP and RPE65 [16] (Table 1, proteins 29 and 38). CRALBP, RPE65 and also RDH5, which was exclusively expressed by native RPE cells (Table 1, protein 37), are proteins playing a key role in the visual cycle [27–29]. CRALBP, RPE65 and RDH5 were abundant in native and absent in cultured RPE cells. Correlating with our results, former research observed that RPE65 and CRALBP, both proteins associated with highly specialized functions of the RPE, were absent in cultured RPE cells [14,30]. Regarding that CRALBP is not only expressed by RPE cells, but also, for instance, by Mueller glial cells [31], we believe that RPE65 is an excellent marker for the verification of native in comparison to cultured RPE, as it was found to be differentially expressed by Western blot analysis, immunocytochemistry and even PCR (Figure 2–4). Another reason for considering RPE65 an attractive protein for further research in ERU is the fact that immunoreactions against RPE65, next to CRALBP and S-Antigen, are known to induce experimental autoimmune uveitis in rats [7,32,33].

Besides cell surface proteins, which were only expressed by native equine RPE cells (Table 1, proteins 23–51), there were 61 proteins exclusively detected in cultured passage-4 RPE cells (Table 1, proteins 52–112). Interestingly, there was a notable increased expression of several clusters of differentiation (CD) molecules in passage-4 cells (Table 1, proteins 59–79) compared to the native state, whereas ion channel protein expression decreased (Table 1). An altered expression of ECM proteins could be observed as well, for instance of fibulin 1, fibulin 2, fibronectin and thrombospondin 1. (Table 1, proteins 85–87 and 108). Thrombospondin 1 is not only an ECM protein expressed by RPE cells, but it is also known to suppress activated T-cells [34], which additionally makes this protein very interesting for ERU research. It was found to be exclusively expressed in cultured equine RPE cells. Fibronectin was also absent in native equine RPE cells, but abundant in passage-4 cells (Table 1, protein 85; Figures 3 and 4). Immunocytochemically, fibronectin shows positive immunoreactivity with a perinuclear expression pattern in passage-4 cells, and no immunoreactivity was observed in native RPE cells (Figure 4). *In vivo*, the RPE basement membrane contains ECM proteins such as laminin, fibronectin, vitronectin and collagen type VI [35]. When RPE is dissociated from the eyecup, the RPE basement membrane remains in the eyecup, and there is no matrix for the RPE cells to attach to *in vitro*. In order to adhere and form a monolayer of epithelial cells *in vitro*, RPE cells begin to produce ECM proteins, such as fibronectin, themselves [36,37]. The perinuclear expression pattern in passage-4 indicates an augmented protein synthesis of the ECM protein fibronectin in passage-4 cells. Furthermore, there was an altered expression of proteins associated with cell adhesion, predominantly integrins (Table 1, proteins 69–72, 76 and 92–95), that are known to not only interact with ECM proteins [38], but also cadherins, catenin, cell adhesion molecule 1, dystroglycan 1, vitronectin and versican (Table 1, proteins 55, 56, 58, 73, 80, 81 and 112). CD49c, which is also known as integrin-alpha 3, belongs to a family of receptors for ECM and cell adhesion molecules [39]. Gullapalli *et al.* observed an increased expression of CD49c on transcriptomic and proteomic level in cultured human RPE cells [40], whereas uncultured human RPE

cells did not express or only expressed low amounts of CD49c. These findings were consistent with their real-time PCR results [40]. We were able to demonstrate an altered expression in passage-4 cells as well, compared to native cells on mRNA and proteomic level (Table 1, protein 70; Figures 2–4). In Western blot analysis, no signal in the lane with native RPE cell lysate was detectable, whereas the lane with passage-4 cell lysate showed a distinct signal. Also, no staining for CD49c could be shown in native cells by immunocytochemistry, confirming CD49c expression on proteomic level to be specific for passaged RPE cells (Figures 2–4).

Interestingly, we showed that the cell surface proteome of equine RPE cells shifted from proteins with RPE specialized functions (CRALBP, RPE65 and RDH5) in native cells (Table 1, proteins 29, 37 and 38; Figures 2–4) to proteins that are associated with cell adhesion and ECM formation (integrins, cell adhesion molecule 1, catenin, thrombospondin 1, fibronectin) in cultured cells (Table 1, proteins 58, 80, 85, 108 and 93–95; Figures 2–4).

The altered expression of molecules that are associated with cell adhesion in passage-4 cells could be clearly demonstrated in Figure 1 (dark green segments). According to Figure 1A, in native equine RPE cells, only 2.29% of all respective proteins are associated with cell adhesion (dark green segment), whereas in passage-4 cells, 12.06% of the expressed proteins are capable of cell adhesion as their biological process (Figure 1B, dark green segment). These observations in equine cells correspond to the findings in cultured human cells where a shift to processes such as cell adhesion could be accordingly displayed [14]. Another notable increase in passage-4 RPE cells could be seen in cell communication (Figure 1A,B, grey segments). As the normal function of the RPE depends on the maintenance of tight adhesions between the cells [41], and cell-cell adhesion and intercellular communication are integrated [42], it is not surprising that this biological process alters concurrently in passage-4 RPE cells (Figure 1A,B, grey segments). Interestingly the relation between cell adhesion and communication remains equal in both states (Figure 1A,B, grey segments).

In contrast to alteration of proteins associated with cell adhesion and communication in passage-4 cells, Figure 1 demonstrates a noticeable decrease of proteins that are associated with transport as their biological process in passage-4 cells (6.74%) (Figure 1B, bright blue segment) compared to the native state (34.86%) (Figure 1A, bright blue segment), correlating with the observations in Table 1, where in passage-4 cells a strong decrease in ion transporting channels was noted.

Our results therefore clearly demonstrate that there is a profound re-organization of the cell surface membrane proteome in cultured equine RPE cells compared to native RPE cells. We believe that one reason for these differences is most probably the *in vitro* situation, which profoundly differs from the situation *in vivo*, where RPE is provided with environmental specific factors by surrounding tissue that are not included in standard cell culture media [43]. The lack of the choroid on the basal side and the retina on the apical side of the cells in culture could lead to a decrease of functions like transport, which is not needed in its entirety *in vitro*. Then again, other functions, as cell-adhesion, become more important. Since retinal tissue is destroyed and retinal architecture is widely disintegrated in ERU [13], we assume that the proteomic changes in diseased eyes are very similar to the changes observed in this study, as disintegrated and destroyed retinae could be compared to a missing retina in culture. In some ways, culture is like a disease state, where a degenerate neural retina no longer sends RPE the signals that modulate key functions [11]. Another reason for the differences in cell surface proteomes of native and cultured RPE cells is that RPE cells do not divide *in vivo*, in contrast to RPE cells *in vitro* [44]. All

of this may lead to an altered expression of proteins, as the proteome is dynamic and changes with the physiological state of the cell [14]. In the past, changes in protein expression due to *in vitro* culturing and passaging, could be observed in cells other than RPE cells as well [45,46]. Our results clearly validated this and demonstrated that, by culturing equine RPE cells, changes in the cell surface proteome occur and that the passage-4 cells only to a limited extent show properties of native physiological RPE cells.

Regarding the short time post mortem until further processing of the equine eyes used in this study in comparison to eyes obtained from human donors, we were able to perform analyses on native RPE cells without loss of proteins due to degradation. By means of biotinylation and LC MS/MS in order to capture, enrich and identify cell surface membrane proteins, we were the first to characterize the cell surface proteome of RPE cells of two different states, native and passage-4. Detecting a total of 28 CD molecules, we contributed to a profile and repertoire of RPE CD antigens of which, to our knowledge, ten have not yet been described to be expressed in RPE cells of any species before (Table 1, proteins 25–27, 59, 60 and 64–67). We believe that a cell surface proteome of healthy equine RPE cells is essential and a necessity in order to compare RPE cells of healthy physiological and diseased pathological state in the future, and thus provides the basis for further research in this field. Furthermore, knowledge of the cell surface proteome of equine RPE cells is not only of great value for research of ERU, but also of major importance for research in the human field of other severe eye diseases with participation of the RPE as ocular tissue, namely Age Related Macular Degeneration (AMD), human autoimmune uveitis and Proliferative Vitreoretinopathy (PVR) [47–49]. Since ERU is the only spontaneous model for human autoimmune uveitis [50], it is of great importance to investigate and understand the pathomechanisms leading to this severe disease. The lack of proteins with highly specialized RPE functions in cultured RPE compared to native cells requires the use of native cells in research. Therefore, we believe that primary cells should be used for experiments in which it is important to evaluate changes in these specialized proteins in healthy versus diseased RPE cells.

Since cultured cells show a great tendency to form intercellular adhesions, these cells could be used for functional studies where tight junctional formation is required, for example as transmigration assays on semi-permeable filter systems. In regard to availability, cultured cells have a significant advantage for the use in research compared to native cells. Further, they can be passaged, and thus multiplied, enabling functional studies to be performed with a much higher amount of cells and a higher diversity of experimental setups.

Nevertheless, future proteomic studies on diseased equine RPE cells have to be conducted to clarify if the shift of the cell surface proteome in cultured equine RPE cells to proteins, which were not detectable in native cells, could be similar to equine RPE cells in diseased state, as was already shown for protein expression profile of dedifferentiated human RPE cells and initial stages of PVR [14].

To summarize, we were the first to provide a characterization of the cell surface proteome of native and cultured equine RPE cells by means of cell surface protein biotinylation and high resolution mass spectrometry. Additionally, we showed that there is a considerable difference between native and cultured equine RPE cells regarding their cell surface protein expression by investigation of differentially expressed proteins. Additionally, we were the first to describe ten CD molecules in equine RPE cells, which, to our knowledge, have not yet been described in the context of RPE cells of any species (Table 1, proteins 25–27, 59, 60 and 64–67). Cultured RPE cells experience a profound

re-organization of the cell surface proteome since only 20.5% of all 112 identified proteins were expressed equally in both cell states. An interesting question that arises is how quickly the proteome of equine RPE cells changes after preparation of native cells and subsequent cultivating. As we set our focus on the comparison between native RPE cells and cells of passage-4, future experiments need to be conducted to evaluate if and when this proteomic shift or a tendency is notable in passage-2 and -3 cells. Nevertheless we believe that we have set a great foundation with regard to future experimental studies on the function of RPE cells in physiological and pathological conditions.

4. Experimental Section

4.1. Preparation of Equine Retinal Pigment Epithelium Cells

No experimental animals were used in this study. Eyes providing healthy equine retinal pigment epithelium samples were obtained at a local abattoir. Eyes were considered normal based on the diagnosis of the veterinarian present at the abattoir, medical histories of the horses as provided by their owners and preliminary histological analysis. The collection and use of equine eyes from animals that were killed due to a research-unrelated cause, was approved for purposes of scientific research by the appropriate board of the veterinary inspection office Munich, Germany (Permit number: 8.175.10024.1319.3). RPE cells from eyes of eight different eye-healthy horses were used in this study, four biological replicates of native cells and four biological replicates of passage-4 cells. For each verification procedure, we had at least two technical replicates (two for PCR and immunocytology, four in Western blots).

RPE cells were prepared as follows: First, residual periocular tissue was carefully removed with forceps and scissors. Then, the intact eyes were rinsed in 70% Ethanol for 2 min followed by a short washing step in cold phosphate buffered saline (PBS). Afterwards, eyes were stored in sterile Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) until further processing. All following preparation steps were performed under a laminar flow hood with sterile instruments. Eye globes were cut open circumferentially, and anterior parts of the eye, vitreous and neurosensory retina, were carefully removed. Posterior eyecups were rinsed twice with 37 °C pre-warmed PBS to wash clear of residual vitreous and retinal tissue without destroying the RPE layer. For complete removal of retinal tissue, especially the rod outer segments, eyecups were filled with pre-warmed 1mM PBS/EDTA pH 7.4 and incubated at room temperature (RT) for 15 min. The PBS/EDTA solution was discarded and, in order to enzymatically detach the RPE cell layer, eyecups were filled with pre-warmed dissociation buffer containing 1 µL papain (CellSystems, Troisdorf, Germany) per milliliter buffer (1 mM PBS/EDTA pH 7.4, 260 mM L-Cysteine, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany, 1% BSA, AppliChem, Darmstadt, Germany). The eyecups were incubated at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere for 25 min. Then, the RPE cells were resuspended in dissociation buffer within the eyecup. The enzymatic activity of papain was blocked by transferring the suspension containing the RPE cells into DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 1% penicilline/streptomycine (P/S). The cell suspension was centrifuged at RT, 130× g for 5 min, and the resulting cell pellet was carefully washed twice with pre-warmed PBS. Finally, the RPE cells were either seeded into T25 cell culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), or biotinylated and processed for mass spectrometry.

For passage-4 cells, RPE cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS and 1% P/S. The cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere until they reached confluence after 14 days of cultivation. For protein expression analysis by mass spectrometry, cells were harvested with Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Germany), washed twice with cold PBS and centrifuged in between washing steps at 4 °C, 500× g for 10 min. Prior to cell lysis, cell surface membrane proteins of 1.6 × 10⁶ passage-4 RPE cells and 5.0 × 10⁵ native RPE cells were labeled with 542 µg biotin and 50 µg biotin, respectively. After 30 min rotation at 4 °C and two centrifugation steps at 2800× g and 16,000× g for 10 min each at 4 °C, cells were lysed with 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 × Roche Complete Protease Inhibitor, EDTA-free; 5 mM 2-Iodacetamide in 10 mM Tris-HCl pH 7.6 and biotinylated cell surface proteins were captured using Streptavidin-beads (IBA, Goettingen, Germany). After extensive washing to remove non-specifically bound proteins, captured proteins were cleaved through digesting beads overnight with trypsin (Promega, Mannheim, Germany) followed by incubation with glycerol-free PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany) at 37 °C. Finally, peptides were analyzed by LC-MS/MS.

4.2. Mass Spectrometry

LC-MS/MS mass spectrometry was performed as previously described [1,5]. Briefly, cell lysates were subjected to on-membrane trypsin digest. Resulting peptides were separated on a reversed phase chromatography column (PepMap, 15 cm × 75 µm ID, 3 µm/100A pore size, LC Packings), which was operated on a nano-HPLC apparatus (Ultimate 3000, Dionex, Idstein, Germany) connected to a linear quadrupole ion-trap Orbitrap (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany). The mass spectrometer was operated in the data-dependent mode to automatically switch between Orbitrap-MS and LTQ-MS/MS acquisition. Survey full scan MS spectra (from *m/z* 300 to 1500) were acquired in the Orbitrap resolution $R = 60,000$ at *m/z* 400. The method used allowed parallel selection of up to the ten most intense ions for fragmentation on the linear ion trap using collision induced dissociation at a target value of 100,000 ions and subsequent dynamic exclusion for 30 s. MS/MS spectra were exported from the Progenesis software as Mascot Generic file (mgf) and used for peptide identification with Mascot (version 2.3.02, Matrix Science: London, UK; available online: <http://www.matrixscience.com>, accessed on 26 June 2012) in the Ensembl database for horse (*Equus caballus*; EquCab2.56.pep, available online: ftp://ftp.ensembl.org/pub/current_fasta/equus_caballus/pep/, accessed on 26 June 2012) containing a total of 22641 protein sequences. A protein was considered as identified if the confidence score was higher than 30 at a significance threshold for the Mascot result of $p \leq 0.01$.

4.3. Gene Ontology (GO)

Gene Ontology annotations were retrieved from Ensembl and EMBL-EBI QuickGO database. GO annotations were available for all identified proteins and were classified based on three organizing principles of GO, namely: biological process, cellular component and molecular function. GO annotations for each protein were hierarchically summarized using AmiGO. Based on these summarized GO annotations pie charts were made, illustrating differences in biological processes, cellular component and molecular function between native and passage-4 equine RPE cells. In this

manuscript pie charts representing differences in biological processes of native and passage-4 RPE cells are presented. Biological processes, which are represented by 1.1% or less of all proteins, are summarized in the field “others” (Figure 1A,B).

4.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

RNA was isolated from freshly isolated equine RPE and cultured RPE of passage-4 using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s protocol. Using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Germany), 2 µg of RNA were reverse transcribed in presence and absence of reverse transcriptase, according to the manufacturer’s protocol. PCR was then performed in a total volume of 50 µL using the cDNA as a template in the presence of specific primers for the respective proteins. Reaction buffer, dNTPs and Taq DNA Polymerase were obtained from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany). The thermocycler, which was used for PCR, was a Tetrad PTC-225 Thermal Cycler (MJ research, St. Bruno (Quebec), Canada). PCR, which was performed on samples that were reverse transcribed to cDNA in the absence of reverse transcriptase, did not show any amplified product. Amplified products were separated by 2% agarose gel electrophoresis, stained with Serva DNA Stain G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) and visualized with UV illumination (Herolab UVT-40M, Wiesloch, Germany) (Figure 2).

4.5. Western Blot Analysis

Retinal pigment epithelial cell pellets were solubilized in lysis buffer (9 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT, 4% CHAPS, and 2.5 mM each of EGTA and EDTA), and protein content was quantified with Bradford assay (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). Equal total protein amounts (5 µg) of RPE samples were resolved in 1D SDS gels and then blotted semidry onto polyvinyl-difluoride membranes (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Unspecific binding was blocked with 5% non-fat dry milk in PBS with 0.05% Tween20 (PBS-T) and 5% goat serum. Blots were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. For verification, we used the following primary antibodies: mouse anti-human beta-actin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany; dilution: 1:7000), rabbit anti-human RPE65 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany; dilution: 1:800), anti-equine CRALBP antiserum (self-made; dilution: 1:1000) [7], rat anti-human CD49c (Ascenion, München, Germany; reported cross-reactivity to horse, dilution: 1:500) and rabbit anti-human Fibronectin (Thermo Scientific, Schwerte, Germany; dilution: 1:1000). After washing, blots were incubated with respective peroxidase-coupled (POD) secondary antibodies (goat anti-rat IgG POD, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany; dilution: 1:3000; goat anti-rabbit IgG POD, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany; dilution: 1:3000; goat anti-mouse IgG POD, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany, dilution: 1:5000; and goat anti-horse IgG Fc-POD, Biozol, Eching, Germany; dilution: 1:10000). Signals were detected by enhanced chemoluminescence (ECL) on X-ray films (Christiansen, Planegg, Germany). Protein expression was quantified after imaging the signals on a transmission scanner using LabScan 5.0 software (GE Healthcare, Freiburg, Germany, 2003) and densitometric analysis with ImageQuantTL software (GE Healthcare, Freiburg, Germany, 2003). Signals were normalized to beta-actin content after staining of lanes with monoclonal mouse anti-beta-actin antibody (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany; dilution: 1:7000) prior to statistical analysis. As Kolmogorov-Smirnov test showed that data

were not distributed normally ($p \leq 0.05$). Mann-Whitney test was applied for calculation of statistical significance ($p \leq 0.05$). Statistical analysis was performed using Paleontological Statistics software (PAST, available online: <http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>, accessed on 3 July 2012).

4.6. Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, native equine RPE cells were set onto glass slides immediately after obtaining these cells from equine eye globes. Equine RPE cells of passage-4 were trypsinized in order to detach them from the cell culture flask and then set onto glass slides. Glass slides were then fixed in ice cold acetone for 10 min, followed by blocking with 1% BSA in PBS-T and 5% normal goat serum for 40 min at RT to prevent unspecific antibody binding. For fluorescence labeling, slides were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: mouse anti-human CRALBP (Santa Cruz, Heidelberg, Germany; dilution: 1:50), rabbit anti-human RPE65 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany; dilution: 1:200), rabbit anti-human Fibronectin (Thermo Scientific, Schwerte, Germany; dilution: 1:500) and rat anti-human CD49c (Ascenion, München, Germany; reported cross-reactivity to horse; dilution: 1:200). Glass slides were then incubated with secondary antibodies for 30 min at RT (Alexa Fluor 546 goat anti-mouse, Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit, Alexa Fluor 546 goat anti-rat; Invitrogen, Karlsruhe, Germany; dilution: 1:500). Cell nuclei were counter-stained with 4',6 Diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen, Karlsruhe, Germany; dilution: 1:1000). Finally, glass slides were mounted with glass cover slips using Dako fluorescent mounting medium (Dako, Hamburg, Germany). Fluorescent images were recorded using Axio Imager M1 or Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany) and Axio Vision 4.6 software (Zeiss, Göttingen, Germany).

5. Conclusions

The results of this study indicate a profound re-organization of the cell surface proteome of passage-4 equine RPE cells compared to native cells. We provided the first proteome profile of cell surface proteins of native and cultured equine RPE cells by means of biotinylation and LC MS/MS. We believe that our findings are a prerequisite and of great value, not only in future ERU research, but also in research of other ocular diseases with participation of the RPE, for example AMD, human autoimmune uveitis or PVR. In our future studies, we will consider the differences in protein expression of native and cultured RPE cells, thus enhancing the transferability of *in vitro* studies to the actual pathomechanisms *in vivo*.

Acknowledgments

This project was financially supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft, PR 1248/2-1 and SFB 571 A5 Deeg. Further, we'd like to thank Margarete Swadzba for critical discussions and Barbara Amann for technical assistance.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hauck, S.M.; Hofmaier, F.; Dietter, J.; Swadzba, M.E.; Blindert, M.; Amann, B.; Behler, J.; Kremmer, E.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Label-free lc-msms analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted wnt signalling inhibitors dkk3 and sfrp2. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 4545–4554.
2. Rotilio, D.; Della Corte, A.; D’Imperio, M.; Coletta, W.; Marcone, S.; Silvestri, C.; Giordano, L.; Di Michele, M.; Donati, M.B. Proteomics: Bases for protein complexity understanding. *Thromb. Res.* **2012**, *129*, 257–262.
3. Doherty, M.K.; Whitfield, P.D. Proteomics moves from expression to turnover: Update and future perspective. *Expert Rev. Proteomics* **2011**, *8*, 325–334.
4. Degroote, R.L.; Hauck, S.M.; Kremmer, E.; Amann, B.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 4536–4544.
5. Hauck, S.M.; Dietter, J.; Kramer, R.L.; Hofmaier, F.; Zipplies, J.K.; Amann, B.; Feuchtinger, A.; Deeg, C.A.; Ueffing, M. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 2292–2305.
6. Wu, C.C.; Yates, J.R., III. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 262–267.
7. Deeg, C.A.; Pompetzki, D.; Raith, A.J.; Hauck, S.M.; Amann, B.; Suppmann, S.; Goebel, T.W.; Olazabal, U.; Gerhards, H.; Reese, S.; *et al.* Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1462–1470.
8. Deeg, C.A.; Raith, A.J.; Amann, B.; Crabb, J.W.; Thurau, S.R.; Hauck, S.M.; Ueffing, M.; Wildner, G.; Stangassinger, M. Cralbp is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin. Dev. Immunol.* **2007**, doi:10.1155/2007/39245.
9. Eberhardt, C.; Amann, B.; Feuchtinger, A.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in muller glial cell-dependent ion and water homeostasis. *Glia* **2011**, *59*, 697–707.
10. Hauck, S.M.; Schoeffmann, S.; Amann, B.; Stangassinger, M.; Gerhards, H.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Retinal mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2121–2131.
11. Rizzolo, L.J.; Peng, S.; Luo, Y.; Xiao, W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retinal Eye Res.* **2011**, *30*, 296–323.
12. Ehrenhofer, M.C.; Deeg, C.A.; Reese, S.; Liebich, H.G.; Stangassinger, M.; Kaspers, B. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet. Ophthalmol.* **2002**, *5*, 39–47.
13. Deeg, C.A.; Ehrenhofer, M.; Thurau, S.R.; Reese, S.; Wildner, G.; Kaspers, B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp. Eye Res.* **2002**, *75*, 127–133.
14. Alge, C.S.; Suppmann, S.; Priglinger, S.G.; Neubauer, A.S.; May, C.A.; Hauck, S.; Welge-Lussen, U.; Ueffing, M.; Kampik, A. Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human rpe cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2003**, *44*, 3629–3641.

15. Parker, R.O.; Crouch, R.K. Retinol dehydrogenases (rdhs) in the visual cycle. *Exp. Eye Res.* **2010**, *91*, 788–792.
16. Dunn, K.C.; Aotaki-Keen, A.E.; Putkey, F.R.; Hjelmeland, L.M. Arpe-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.* **1996**, *62*, 155–169.
17. Hamel, C.P.; Tsilou, E.; Pfeffer, B.A.; Hooks, J.J.; Detrick, B.; Redmond, T.M. Molecular cloning and expression of rpe65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 15751–15757.
18. Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 845–881.
19. Strauss, O. The Retinal Pigment Epithelium. In *The Organization of the Retina and Visual System*; Kolb, H., Fernandez, E., Nelson, R., Eds.; University of Utah Health Sciences Center: Salt Lake City, UT, USA, 1995. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54392/> (accessed on 30 October 2012).
20. Deeg, C.A.; Altmann, F.; Hauck, S.M.; Schoeffmann, S.; Amann, B.; Stangassinger, M.; Ueffing, M. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* **2007**, *7*, 1540–1548.
21. Greer, S.; Honeywell, R.; Geletu, M.; Arulanandam, R.; Raptis, L. Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *J. Immunol. Methods* **2010**, *355*, 76–79.
22. Burke, J.M.; Cao, F.; Irving, P.E.; Skumatz, C.M. Expression of e-cadherin by human retinal pigment epithelium: Delayed expression *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1999**, *40*, 2963–2970.
23. Alcazar, O.; Hawkrige, A.M.; Collier, T.S.; Cousins, S.W.; Bhattacharya, S.K.; Muddiman, D.C.; Marin-Castano, M.E. Proteomics characterization of cell membrane blebs in human retinal pigment epithelium cells. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2201–2211.
24. Muramatsu, T.; Miyauchi, T. Basigin (cd147): A multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol. Histopathol.* **2003**, *18*, 981–987.
25. Philp, N.J.; Wang, D.; Yoon, H.; Hjelmeland, L.M. Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and arpe-19 cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2003**, *44*, 1716–1721.
26. Gundersen, D.; Orłowski, J.; Rodriguez-Boulan, E. Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **1991**, *112*, 863–872.
27. Wolf, G. Function of the protein RPE65 in the visual cycle. *Nutr. Rev.* **2005**, *63*, 97–100.
28. McBee, J.K.; Van Hooser, J.P.; Jang, G.F.; Palczewski, K. Isomerization of 11-cis-retinoids to all-trans-retinoids *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48483–48493.
29. Huang, J.; Possin, D.E.; Saari, J.C. Localizations of visual cycle components in retinal pigment epithelium. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 223–234.
30. Milyushina, L.A.; Verdiev, B.I.; Kuznetsova, A.V.; Aleksandrova, M.A. Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2012**, *153*, 157–162.

31. Limb, G.A.; Salt, T.E.; Munro, P.M.; Moss, S.E.; Khaw, P.T. *In vitro* characterization of a spontaneously immortalized human muller cell line (mio-m1). *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2002**, *43*, 864–869.
32. Ham, D.I.; Gentleman, S.; Chan, C.C.; McDowell, J.H.; Redmond, T.M.; Gery, I. Rpe65 is highly uveitogenic in rats. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2002**, *43*, 2258–2263.
33. Deeg, C.A.; Reese, S.; Gerhards, H.; Wildner, G.; Kaspers, B. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2004**, *45*, 2286–2292.
34. Mochizuki, M. Regional immunity of the eye. *Acta Ophthalmol.* **2010**, *88*, 292–299.
35. Ho, T.C.; Del Priore, L.V. Reattachment of cultured human retinal pigment epithelium to extracellular matrix and human bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1997**, *38*, 1110–1118.
36. LI, W.; Stramm, L.E.; Aguirre, G.D.; Rockey, J.H. Extracellular matrix production by cat retinal pigment epithelium *in vitro*: Characterization of type iv collagen synthesis. *Exp. Eye Res.* **1984**, *38*, 291–304.
37. Campochiaro, P.A.; Jerdon, J.A.; Glaser, B.M. The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cell *in vivo* and its synthesis *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1986**, *27*, 1615–1621.
38. Aisenbrey, S.; Zhang, M.; Bacher, D.; Yee, J.; Brunken, W.J.; Hunter, D.D. Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2006**, *47*, 5537–5544.
39. Clegg, D.O.; Mullick, L.H.; Wingerd, K.L.; Lin, H.; Atienza, J.W.; Bradshaw, A.D.; Gervin, D.B.; Cann, G.M. Adhesive events in retinal development and function: The role of integrin receptors. *Results Probl. Cell Differ.* **2000**, *31*, 141–156.
40. Gullapalli, V.K.; Sugino, I.K.; Zarbin, M.A. Culture-induced increase in alpha integrin subunit expression in retinal pigment epithelium is important for improved resurfacing of aged human bruch's membrane. *Exp. Eye Res.* **2008**, *86*, 189–200.
41. Chu, P.G.; Grunwald, G.B. Identification of an adhesion-associated protein of the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1990**, *31*, 847–855.
42. Singer, S.J. Intercellular communication and cell-cell adhesion. *Science* **1992**, *255*, 1671–1677.
43. Karl, M.O.; Valtink, M.; Bednarz, J.; Engelmann, K. Cell culture conditions affect RPE phagocytic function. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2007**, *245*, 981–991.
44. Nagai, H.; Kalnins, V.I. Normally occurring loss of single cells and repair of resulting defects in retinal pigment epithelium *in situ*. *Exp. Eye Res.* **1996**, *62*, 55–61.
45. Vacanti, V.; Kong, E.; Suzuki, G.; Sato, K.; Canty, J.M.; Lee, T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J. Cell Physiol.* **2005**, *205*, 194–201.
46. Hauck, S.M.; Suppmann, S.; Ueffing, M. Proteomic profiling of primary retinal muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to *in vitro* conditions. *Glia* **2003**, *44*, 251–263.
47. Bhutto, I.; Luttly, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol. Aspects Med.* **2012**, *33*, 295–317.

48. Machemer, R. Proliferative vitreoretinopathy (PVR): A personal account of its pathogenesis and treatment. Proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1988**, *29*, 1771–1783.
49. Bodaghi, B.; Rao, N. Relevance of animal models to human uveitis. *Ophthalmic Res.* **2008**, *40*, 200–202.
50. Deeg, C.A.; Hauck, S.M.; Amann, B.; Pompetzki, D.; Altmann, F.; Raith, A.; Schmalzl, T.; Stangassinger, M.; Ueffing, M. Equine recurrent uveitis—A spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res.* **2008**, *40*, 151–153.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

4 DISKUSSION

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU), die auch als periodische Augenentzündung, Iridozyklitis oder Mondblindheit bezeichnet wurde (Gilger and Michau 2004), ist eine entzündliche Augenerkrankung, die mit einer Prävalenz von circa 10% in der Pferdepopulation auftritt und weltweit die häufigste Ursache für den Verlust des Visus bei Pferden darstellt (Deeg 2009, Zipplies et al. 2012). Die Ätiologie dieser schmerzhaften Augenerkrankung ist bisher nicht bekannt, jedoch weiß man heute, dass es sich um eine immun-medierte Erkrankung handelt (Zipplies et al. 2012), die durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke (BRS) und den Übertritt autoreaktiver T-Lymphozyten in das Augeninere gekennzeichnet ist (Gilger et al. 1999, Deeg et al. 2007a). Der äußere Anteil der BRS, bestehend aus interzellulären Tight-Junctions zwischen retinalen Pigmentepithel-Zellen (RPE-Zellen) (Kaur et al. 2008), stellt beim Pferd die hauptsächliche Barriere zwischen der Blutseite und dem Auginneren dar. Grund dafür ist die beim Pferd sehr geringe Ausprägung retinaler Gefäße (Ehrenhofer et al. 2002, Eberhardt et al. 2011), deren Endothelzellen und interzelluläre Tight-Junctions die innere BRS bilden (Kaur et al. 2008). Der Zusammenbruch der äußeren BRS konnte in Augen von an ERU erkrankten Pferden immunhistochemisch eindeutig bestätigt werden (Deeg et al. 2002a) und wirft die Frage auf, welche Faktoren für die Durchlässigkeit von Entzündungszellen durch das RPE verantwortlich sind sowie den letztendlichen Zusammenbruch der äußeren BRS bei der ERU begünstigen. Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, eine equine RPE-Zelllinie zu kultivieren und proteomisch zu charakterisieren. Diese Zelllinie der barriere-bildenden RPE-Zellen soll in Zukunft als stabiles *in vitro* Modell der äußeren BRS des Pferdes dienen und so die Forschung an zugrundeliegenden Pathogenesemechanismen der ERU voranbringen. Aufgrund der ausgesprochen guten Verfügbarkeit gesunder, enukleierter Augen von Schlachtpferden ist es uns gelungen, eine Primärkultur von equinen RPE-Zellen zu isolieren und anschließend *in vitro* zu kultivieren. Diese pigmentierten kubischen Zellen zeigten ein deutliches Teilungspotenzial und konnten bereits nach wenigen Tagen passagiert werden. Für die vorliegende Studie wurden native equine RPE-Zellen und kultiviertes RPE der Passage 4 miteinander verglichen, da equine RPE-Zellen dieser Passage bereits unpigmentiert waren und daher Grund zur Annahme boten, dass auch weitere

Merkmale der kultivierten RPE-Zellen sich veränderten. Da initiale Vorgänge der ERU zuerst an Plasmamembranproteinen als exponierte Strukturen an Zelloberflächen vermutet werden (Hauck et al. 2010), wurden die untersuchten Zellen zur Anreicherung von Membranproteinen biotinyliert.

Zur Charakterisierung des equinen RPE-Oberflächenproteoms und zur Erfassung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden in der Proteinexpression des equinen RPE im nativen und kultivierten Zustand wurden die von den Zellen exprimierte Proteine massenspektrometrisch (LC-MS/MS) identifiziert. Einige proteomische Untersuchungen und Charakterisierungen verschiedener RPE-Zellen des Menschen wurden bereits in der Vergangenheit durchgeführt. Beispielsweise gibt es eine Studie, bei der massenspektrometrisch identifizierte Proteine nativer und kultivierter RPE-Zellen des Menschen miteinander verglichen wurden (Alge et al. 2003). Eine weitere vergleichende Studie beschäftigte sich mit der Proteinexpression bei kultivierten primären RPE-Zellen des Menschen und bei humanen Zelllinien, wie hTERT-RPE und ARPE-19 (Alge et al. 2006). Eine andere Studie hingegen untersuchte massenspektrometrisch mitochondriale Proteine des RPE von an AMD erkrankten Personen (Nordgaard et al. 2008). Es gibt jedoch unseres Wissens nach bisher keine Studie, wie die hier vorliegende, bei der das Oberflächenproteom physiologischer RPE-Zellen (nativ und kultiviert) einer bestimmten Spezies angereichert, charakterisiert und verglichen wurde. Diese Studie ist daher eine erstmalige Beschreibung angereicherter Oberflächenproteine physiologischer RPE-Zellen. Die Charakterisierung des Oberflächenproteoms equiner RPE-Zellen stellt zudem eine gute Basis zur Verwendung dieser Zellen in der Forschung dar. In Zukunft sollen anhand funktioneller Studien an RPE-Zellen des Pferdes Erkenntnisse zur Pathogenese der ERU gewonnen werden. Da die ERU das einzige spontane Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen ist (Deeg et al. 2008), tragen zukünftig gewonnene Erkenntnisse zur Rolle der äußeren BRS bei der ERU möglicherweise zum genaueren Verständnis der Pathogenese bei der autoimmunen Uveitis des Menschen bei.

Insgesamt wurden bei den nativen und kultivierten RPE-Zellen 112 Proteine massenspektrometrisch identifiziert, wovon aufgrund der Anreicherung 84% Membranproteine waren. Achtundzwanzig der insgesamt 112 Proteine waren nur bei nativen RPE-Zellen detektierbar (Publikation, Tabelle 1; Proteine 24-51), wohingegen

61 nur bei den kultivierten RPE-Zellen vorhanden waren (Publikation, Tabelle 1; Proteine 52-112). Die Liste jener Proteine, die von nativen und passagierten Zellen zugleich exprimiert wurden, umfasste 23 Proteine (Publikation; Tabelle 1, Proteine 1-23). Unter diesen Proteinen befand sich β -Actin (Publikation; Tabelle 1, Protein 3), ein ubiquitär vorkommendes Housekeeping-Protein (Greer et al. 2010). Die gleichmäßige Expression des β -Actins in beiden Zellzuständen wurde zusätzlich zur massenspektrometrischen Analyse mittels PCR und Western Blot verifiziert (Publikation, Abb. 2 und 3). Dies bestätigte β -Actin als verlässliches Housekeeping-Protein equiner RPE-Zellen beider Zellzustände und wurde zum Normalisieren beim Western Blot verwendet. Des Weiteren wurden sechs Zytokeratine detektiert (Publikation, Tabelle 1; Proteine 7-12), die typische Proteine für epitheliale Zellen wie RPE-Zellen darstellen (Kivela and Uusitalo 1998, Liggett et al. 2009). Zudem wurden bei beiden Zellzuständen sieben Transportproteine identifiziert, worunter sich drei Na^+/K^+ ATPasen befanden (Publikation, Tabelle 1; Proteine 15–17). Na^+/K^+ ATPasen des RPE befördern apikal Na^+ aus der Zelle in den subretinalen Raum und erhalten dadurch den Na^+ -Ionengradienten, der für die ordentliche Funktionsfähigkeit der Photorezeptoren benötigt wird (Shimura et al. 1999, Sonoda et al. 2009). Anders als bei vielen anderen Epithelien sind Na^+/K^+ ATPasen des RPE hauptsächlich apikal (zur retinalen Seite) lokalisiert (Gundersen et al. 1991, Shimura et al. 1999, Rajasekaran et al. 2003) und können daher als Polarisationsmarker bei RPE-Zellen verwendet werden (Sonoda et al. 2009). Studien zur Bestätigung einer hauptsächlich apikalen Lokalisation dieser Proteine beim equinen RPE wurden bisher noch nicht durchgeführt. Mittels Immunhistochemie und unter Verwendung von Antikörpern gegen diese bestimmten Na^+/K^+ ATPasen könnte zukünftig die Lokalisation dieser Transportproteine auch bei equinen RPE-Zellen untersucht werden.

Zusätzlich befand sich unter den identifizierten Transportproteinen der Glukosetransporter GLUT1 (Publikation, Tabelle 1; Protein 21). Glukose ist die Hauptenergiequelle der Retina, die bei Menschen und anderen Vertebraten einen dreimal höheren Glukoseverbrauch als andere Gewebe des Körpers aufweist (Senanayake et al. 2006). Die Expression dieses speziellen Glukosetransporters bei equinen RPE-Zellen deckt sich mit Daten des RPE beim Menschen, bei dem GLUT1 das Haupttransportprotein für den Glukosetransport zwischen Choriocapillaris und der Retina darstellt (Takagi et al. 1994, Senanayake et al. 2006). In einer Studie zum

Glukoseverbrauch humaner RPE Kulturen konnte gezeigt werden, dass RPE-Zellen auch in Kultur Glukose aus dem Kulturmedium über den Transporter GLUT1 aufnehmen (Senanayake et al. 2006). Die stabile Expression von GLUT1 in beiden Zellzuständen equiner RPE-Zellen ist vermutlich ebenfalls darauf zurückzuführen, dass Glukose bei den kultivierten Zellen aus dem Glukose-haltigen Kulturmedium über diesen Transportkanal aufgenommen wird.

Ein interessantes Protein, das ebenfalls von nativen und passagierten equinen RPE-Zellen exprimiert wurde war Basigin (Publikation, Tabelle 1; Protein 2). Basigin ist ein transmembranes Glykoprotein, welches in hohen Mengen von Müllerzellen und dem RPE exprimiert wird (Philp et al. 2003a). Bereits früher konnten Forschergruppen mittels Immunpräzipitation und Basigin-Silencing-Experimenten zeigen, dass Basigin spezifische Interaktionen mit β 1-Integrinen eingeht und dadurch an Zell-Adhäsionen beteiligt sein könnte (Berditchevski et al. 1997, Nishibaba et al. 2012). Interessanterweise befand sich unter den 23 in beiden Zellzuständen exprimierten Proteinen auch CD29, ein β 1-Integrin (Publikation, Tabelle 1; Protein 4). Diese Tatsache könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Interaktion der beiden Proteine ebenfalls im RPE des Pferdes eine Rolle bei der Zelladhäsion und so bei der Integrität der Barrierefunktion des RPE spielen könnte. Mittels Immunhistochemie könnte beispielsweise eine Co-Lokalisation beider Proteine bei equinen RPE-Zellen bestätigt werden. Des Weiteren könnte mit Hilfe von *in vitro* Silencing-Versuchen (zum Beispiel Silencing von Basigin bei equinen RPE-Zellen) ein möglicher Verlust der Integrität der Barriere untersucht werden. Eine Beteiligung des Basigins bei Multipler Sklerose wird stark angenommen (Agrawal et al. 2012), da bei ihrer experimentellen Form, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), mittels Western Blot und Immunzytochemie gezeigt werden konnte, dass bei Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) eine vermehrte Expression von Basigin mit einer erhöhten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), vornehmlich MMP9 einhergeht (Agrawal et al. 2011). Zudem konnte bei der EAE gezeigt werden, dass die Blockade der Aktivität von Basigin mit Hilfe von Antikörpern zu einer reduzierten Aktivität von MMPs führte und mit reduzierter Transmigration von Entzündungszellen in das ZNS einherging (Agrawal et al. 2011). MMPs sind eine große Familie von Zink- und Kalziumabhängigen Enzymen, die Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) degradieren und dadurch Barrierestrukturen lockern können

(Vermeer et al. 2009). Bereits in früheren Studien konnte in Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden eine deutlich erhöhte Konzentration an MMP9 im Vergleich zu Kontrollproben festgestellt werden (Hofmaier et al. 2011). Gleichzeitig konnten in Glaskörpern von an ERU erkrankten Tieren T-Lymphozyten, welche die BRS überwunden hatten, nachgewiesen werden (Hofmaier et al. 2011). Die Rolle von Basigin ist im Zusammenhang mit der ERU bisher nicht untersucht worden. Möglich wäre, dass bei der ERU ebenfalls eine funktionelle Verknüpfung zwischen MMP9 und dem Basigin besteht. Zum Beispiel ist denkbar, dass Basigin die Expression von MMP9 bei Leukozyten verstärkt und es dadurch zu einer erhöhten Durchlässigkeit der äußeren BRS bei der ERU kommt. Dies könnte man im Zellkulturmodell der BRS beispielsweise mittels Stimulation equiner Leukozyten durch Basigin und ihrer Wirkung auf die Integrität der äußeren BRS (zum Beispiel durch Messung transepithelialer Widerstände nach Zugabe stimulierter Leukozyten) feststellen.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Proteinen, die von equinen RPE-Zellen beider Zellzustände (nativ und kultiviert) exprimiert wurden, konnten von den insgesamt 112 massenspektrometrisch identifizierten Proteinen 28 nur bei nativen equinen RPE-Zellen detektiert werden (Publikation, Tabelle 1; Proteine 24–51). Hierzu zählte unter anderem CRALBP (Publikation, Tabelle 1; Protein 29). CRALBP ist ein Protein, das in der Iris, im Ziliarkörper, in Müllerzellen der Retina und auch vom RPE exprimiert wird (Wu et al. 2006). Durch seine hohe Affinität zu cis-Retinoiden spielt CRALBP eine wichtige Rolle im Retinalzyklus (Huang et al. 2009). Obwohl CRALBP auch von anderen Strukturen innerhalb des Auges exprimiert wird (Wu et al. 2006), findet es hauptsächlich Verwendung als Markerprotein des RPE verschiedener Spezies wie zum Beispiel der Ratte (Al-Hussaini et al. 2008), des Schweines (Fernandez-Bueno et al. 2012), des Rindes (Liggett et al. 2009) und des Menschen (Alge et al. 2003). Diese Studie hat nun gezeigt, dass auch das RPE des Pferdes CRALBP exprimiert. Die Expression dieses Proteins beim Pferd beschränkt sich jedoch nur auf native RPE-Zellen – im kultivierten equinen RPE konnte CRALBP nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich zur massenspektrometrischen Analyse konnte dies mittels weiterer Methoden, wie der PCR, des Western Blot und der Immunzytochemie verifiziert werden (Publikation, Abb. 2, 3 und 4). Die vorhandene Expression von CRALBP in nativen RPE-Zellen des Pferdes und dessen Fehlen in kultivierten Zellen macht CRALBP zu einem verlässlichen Marker für natives equines

RPE. Ein Zusammenhang zwischen CRALBP und der ERU wurde früher bereits untersucht, wobei CRALBP als potentes Uveitogen beim Pferd identifiziert wurde (Deeg et al. 2006b). Kurz darauf konnte CRALBP auch als Autoantigen bei der autoimmunen Uveitis des Menschen verifiziert werden und bestätigte damit die Funktion der ERU als wichtiges Tiermodell für die autoimmune Uveitis beim Menschen (Deeg et al. 2007b, Deeg et al. 2008).

Des Weiteren wurde nur bei nativen equinen RPE-Zellen RPE65 nachgewiesen (Publikation, Tabelle 1; Protein 38). Dabei handelt es sich um ein RPE-spezifisches Protein, welches sowohl bei Säugetieren (Hamel et al. 1993), als auch bei Hühnern (Moiseyev et al. 2008) und dem Zebrafisch (Schonthaler et al. 2007) beschrieben wurde. Wie CRALBP ist auch RPE65 eines der Schlüsselenzyme des Retinalzyklus – hier wandelt es innerhalb des RPE all-trans Retinylester zu 11-cis Retinol um (Yuan et al. 2010). RPE65 gilt als spezifisches Markerprotein von RPE-Zellen verschiedener Spezies (Alge et al. 2003, Al-Hussaini et al. 2008, Liggett et al. 2009, Fernandez-Bueno et al. 2012). Da die Expression von RPE65, mit nur sehr wenigen Ausnahmen wie beispielsweise der Zelllinie ARPE-19 (Dunn et al. 1996), auf native differenzierte RPE-Zellen beschränkt ist, gilt RPE65 als Differenzierungsmarker für RPE-Zellen (Steindl-Kuscher et al. 2009, Ahmado et al. 2011). Mittels Massenspektrometrie, PCR, Western Blot und Immunzytochemie konnte die Expression von RPE65 in nativen equinen RPE-Zellen, aber auch das Fehlen dieses Proteins im kultivierten equinen RPE verifiziert werden (Publikation, Abb. 2, 3 und 4). Wie CRALBP stellt daher auch RPE65 ein Markerprotein dar, welches native equine RPE-Zellen deutlich von kultiviertem RPE abgrenzt und kann daher auch bei equinen RPE-Zellen als Differenzierungsmarker verwendet werden. Die Rolle des RPE65 als Autoantigen wurde an verschiedenen Rattenlinien erforscht (Ham et al. 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass RPE65-immunisierte Lewis-, BN- und Fischer- Ratten eine ausgeprägte beidseitige Uveitis entwickelten (Ham et al. 2002). Histologisch konnte in Augen der untersuchten Tiere eine Akkumulation von Entzündungszellen (hauptsächlich polymorph-kernige Leukozyten) in verschiedenen Bereichen des Auges, wie dem Ziliarkörper, der Iris, apikal des RPE im subretinalen Raum sowie der Retina gezeigt werden (Ham et al. 2002). Ein kompletter entzündungsbedingter Verlust retinaler Architektur konnte bei RPE65-induzierter Uveitis bei den Ratten nicht beobachtet werden (Ham et al. 2002). Ein Zusammenhang zwischen RPE65

und der ERU wurde bisher nicht erforscht. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die Expression von RPE65 bei RPE-Zellen von an ERU erkrankten Pferden gegenüber gesunden Kontrollen verändert. Dies könnte quantitativ (zum Beispiel mittels Western Blot) festgestellt werden und einen ersten Anhaltspunkt bezüglich einer Beteiligung von RPE65 an der Pathogenese der ERU liefern.

Als ein weiteres Retinalzyklus-assoziiertes Protein wurde RDH5 in equinen RPE-Zellen identifiziert (Publikation, Tabelle 1; Protein 37). Dessen Expression war wie auch bei CRALBP und RPE65 auf natives equines RPE beschränkt. RDH5 ist eine 11-cis Retinol Dehydrogenase und bewirkt innerhalb des RPE die Oxidation von 11-cis Retinol zu 11-cis Retinal (Parker and Crouch 2010). Aufgrund der Tatsache, dass RDH5 hauptsächlich von RPE-Zellen exprimiert wird (Ajmal et al. 2012) könnte RDH5, wie die beiden anderen identifizierten Proteine des Retinalzyklus, CRALBP und RPE65 (Huang et al. 2009), auch als Markerprotein nativer differenzierter RPE-Zellen des Pferdes dienen. Insofern sollte die differenzielle Expression von RDH5 mit Hilfe weiterer Methoden (zum Beispiel PCR, Western Blot oder Immunzytochemie) verifiziert werden.

CD107a und CD107b sind zwei weitere Proteine, die nur von nativen equinen RPE-Zellen exprimiert wurden (Publikation, Tabelle 1; Proteine 25 und 26). Diese beiden Membranproteine, die auch als Lysosomal-assoziierte Membranproteine 1 und 2 bezeichnet werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose, da sie die lysosomalen Bestandteile von Phagolysosomen darstellen (Huynh et al. 2007). Phagolysosomen sind fusionierte Organellen, welche hydrolytisch wirksame Enzyme, reaktive Sauerstoffspezies und antimikrobielle Peptide enthalten, um beispielsweise internalisierte Mikroorganismen, aber auch zellulären Debris und apoptotische Zellen zu zersetzen (Huynh et al. 2007, Karavitis and Kovacs 2011). Phagozytose wird von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten betrieben (Minakami et al. 2010, Karavitis and Kovacs 2011), aber auch das RPE eliminiert über Phagozytose abgestoßene äußere Segmente von Photorezeptoren (Kevany and Palczewski 2010, Nandrot et al. 2012). Dies stellt einen wichtigen Prozess für die physiologische Funktionsfähigkeit der Retina dar und wird unter anderem von Phagolysosomen innerhalb des RPE übernommen (Deguchi et al. 1994). Wie sich herausstellte wurde in früheren Studien zur Phagozytose durch RPE-Zellen CD107a als lysosomaler Zellmarker bei fötalem humanem RPE und der

humanen Zelllinie D407 benutzt (Finnemann et al. 2002, Gordiyenko et al. 2010). Aber auch bei der humanen Zelllinie ARPE-19 wurden CD107a und b als Indikatoren lysosomaler Aktivität bei der Phagozytose verwendet (Chen P. M. et al. 2011). Die Expression dieser beiden Proteine konnte in kultivierten equinen RPE-Zellen massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden, was auf das Fehlen dieser lysosomalen Proteine und daher auf eine reduzierte Phagozytosefunktion kultivierter equiner RPE-Zellen hindeutet.

Des Weiteren wurde massenspektrometrisch eine hohe Anzahl an Transportproteinen in nativen equinen RPE-Zellen identifiziert (34.9% der identifizierten Proteine des nativen equinen RPE). Unter anderem handelte es sich dabei um zahlreiche Transportproteine für Ionen (wie zum Beispiel Na^+ , K^+ , Cl^- und HCO_3^-), Aminosäuren, Stoffwechsellendprodukte und Neurotransmitter (Publikation, Tabelle 1; Proteine 39-49). Zu den im nativen RPE identifizierten Transportproteinen für Neurotransmitter zählten beispielsweise Taurin-, Glycin- und GABA-Transporter (Publikation, Tabelle 1; Proteine 44, 45 und 46). Das Fehlen solcher Proteine in kultivierten equinen RPE-Zellen, könnte darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund der apikal des RPE fehlenden Retina unter Kulturbedingungen die Ausschüttung bestimmter Stoffe, wie zum Beispiel Neurotransmitter ausbleibt. Folglich ist es sehr wahrscheinlich, dass kultivierte Zellen die Expression entsprechender Transportproteine herunterregulierten, sodass sie nur in nativen, jedoch nicht mehr in kultivierten equinen RPE-Zellen nachweisbar waren.

MCT1, das als apikales Transportprotein für den transepithelialen Transport von Laktat bei nativen RPE-Zellen des Menschen beschrieben wurde (Philp et al. 2003b) konnte auch bei nativen equinen RPE-Zellen detektiert werden (Publikation, Tabelle 1; Protein 42). Mittels Co-Immunpräzipitations-Versuchen konnte bereits in früheren Studien an Ratten-Zellen gezeigt werden, dass die MCT1-Expression auf Zelloberflächen von Basigin als Chaperon-Protein abhängig ist (Kirk et al. 2000). Bei Knock-out Mäusen, die das Protein Basigin nicht exprimierten ($\text{Bsg}^{-/-}$ -Mäuse) wurde nachgewiesen, dass die Basigin-Depletion mit einem Verlust der Expression von MCT1 im RPE einhergeht (Philp et al. 2003a). Da bei den hier untersuchten equinen RPE-Zellen Basigin massenspektrometrisch im nativen und im kultivierten RPE identifiziert werden konnte, muss die fehlende Expression von MCT1 bei kultivierten RPE-Zellen des Pferdes auf einen anderen Umstand zurückzuführen sein. Aufgrund

der Metabolisierung von Glukose entsteht in der Retina Laktat, welches sich im subretinalen Raum ansammelt und apikal über MCT1 von RPE-Zellen aufgenommen wird (Daniele et al. 2008). Ein möglicher Grund für das Fehlen von MCT1 in kultivierten equinen RPE-Zellen könnte sein, dass im verwendeten Medium für equines RPE wenig Laktat anfällt, welches über MCT1 in die RPE-Zellen aufgenommen werden müsste und dadurch die Expression dieses Proteins herunterreguliert wird. Im Gegensatz zu kultivierten equinen RPE-Zellen wird MCT1 bei der humanen RPE-Zelllinie ARPE-19 exprimiert (Philp et al. 2003b, Majumdar et al. 2005), was die Differenzierung und daher die Ähnlichkeit von ARPE-19 zu nativen RPE-Zellen weiter unterstreicht.

Das Kanalprotein Kir7.1, das für den spezifischen transepithelialen Transport von K^+ zwischen der Retina und dem RPE verschiedener Säugetiere bereits beschrieben wurde (Yang et al. 2008b) konnte ebenfalls im nativen equinen RPE identifiziert werden (Publikation, Tabelle 1; Protein 36). Damit wurde massenspektrometrisch das Vorhandensein dieses spezifischen Kanalproteins des RPE, neben der Ratte, dem Rind und dem Menschen (Yang et al. 2008b) hier zum ersten Mal auch beim Pferd nachgewiesen. Weitere Untereinheiten des Kalium-Transportproteins, wie sie bei RPE-Zellen des Menschen beschrieben wurden (Yang et al. 2008b) waren beim Pferd in dieser Studie nicht nachweisbar.

Physiologische native RPE-Zellen des Pferdes exprimierten Proteine mit vielfältigen Aufgaben, die bereits bei RPE-Zellen anderer Spezies beschrieben wurden. Zusätzlich zum spezifischen RPE-Marker RPE65, kann natives equines RPE daher anhand dieser Proteine identifiziert werden. Zudem verdeutlicht die Expression der vielen Transportproteine die ausgeprägte transepitheliale Transportkapazität des nativen equinen RPE zwischen der Blutseite und der Retina.

Kultivierte equine RPE-Zellen ließen im Vergleich zu nativen RPE-Zellen eine deutlich veränderte Expression von Proteinen erkennen. So machten beispielsweise Proteine mit Transportfunktion bei kultivierten equinen RPE-Zellen nur 6.7% der identifizierten Proteine aus, wohingegen Transportproteine im nativen equinen RPE 34.9% der identifizierten Proteine stellten (Publikation, Abb. 1). Das kultivierte equine RPE hingegen zeigte eine auffallend erhöhte Expression an Proteinen, die an Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix- Verbindungen beteiligt sind. So stellten Proteine aus dieser Gruppe bei den nativen Zellen nur 2.3%, bei den kultivierten Zellen hingegen

12.1% der identifizierten Proteine dar (Publikation, Abb. 1) – hierzu zählen unter anderem Proteine aus der Familie der Integrine. Dabei handelt es sich um transmembrane Rezeptoren, die aus α - und β -Untereinheiten bestehen (Yue et al. 2012). Integrine stellen eine Verbindung zwischen dem Zytoplasma und der extrazellulären Umgebung, der sogenannten extrazellulären Matrix (EZM) einer Zelle her und zählen daher zu den Zelladhäsionsmolekülen (Milner and Campbell 2002, Brizzi et al. 2012). Zudem regulieren Integrine die Migration, Proliferation, den Erhalt und die Differenzierung von Zellen (Brizzi et al. 2012). Bis heute konnten beim Menschen 24 Integrin-Heterodimere identifiziert werden, die sich aus 18 α - und 8 β -Untereinheiten zusammensetzen (Goodman and Picard 2012, Lowell and Mayadas 2012, Yue et al. 2012). Bei kultivierten equinen RPE-Zellen wurden insgesamt 10 Proteine aus der Familie der Integrine identifiziert (Publikation, Tabelle 1, Proteine 69-73, 76 und 93-95) – native equine RPE-Zellen exprimierten lediglich eines dieser Proteine (Publikation, Tabelle 1; Protein 4). Die differenzielle Expression von einem der insgesamt 10 identifizierten Integrine (CD49c oder Integrin $\alpha 3$) wurde mittels PCR, Western Blot und immunzytochemisch verifiziert (Publikation, Abb. 2, 3 und 4). Alle vier Methoden lieferten übereinstimmende Ergebnisse und untermauern das Fehlen im nativen und die Expression des Proteins im kultivierten Zustand der Zelle. Von RPE-Zellen des Menschen ist bekannt, dass natives RPE nur geringe Mengen an Integrinen exprimiert und dass eine Kultivierung des RPE zur Folge hat, dass Integrine verstärkt exprimiert werden (Zarbin 2003, Gullapalli et al. 2008, Afshari and Fawcett 2009). Humanes RPE, das auf einer EZM kornea-endothelialen Ursprungs kultiviert wurde, zeigte im Vergleich zu nativen RPE-Zellen eine deutliche differenzielle Expression bestimmter α -Integrine, darunter auch CD49c (Gullapalli et al. 2008). Die Expression der Integrine des nativen humanen RPE war sehr viel geringer oder fehlte gar völlig, wohingegen nach Kultivierung der RPE-Zellen die Expression deutlich angestiegen war (Gullapalli et al. 2008). Die Autoren sahen den möglichen Grund für die gezeigten Unterschiede unter anderem in der geänderten Zusammensetzung der verwendeten EZM (EZM kornea-endothelialen Ursprungs) im Vergleich zu den EZM-Komponenten der Bruch-Membran *in vivo* (Gullapalli et al. 2008). Dies könnte ebenso ein Grund für die differenzielle Expression der Integrine bei den equinen RPE-Zellen in der vorliegenden Studie sein, denn gegenüber nativem RPE des Pferdes konnte im kultivierten equinen RPE eine erhöhte

Expression an EZM-Proteinen detektiert werden. Frühere Studien an RPE-Zellen des Menschen haben gezeigt, dass RPE-Zellen in der Lage sind unter Kulturbedingungen Komponenten der EZM, ähnlich wie sie *in vivo* vorhanden sind, selbst zu produzieren (Campochiaro et al. 1986). Equine RPE-Zellen haben möglicherweise aufgrund des kulturbedingten Fehlens der Bruch-Membran und somit einer EZM, verstärkt EZM-Proteine exprimiert um sich dadurch selbst ein geeignetes Substrat zu schaffen. Verschiedene EZM- und EZM-assoziierte Proteine, wie beispielsweise Adhican (Gabrielsen et al. 2007), Syndecan-2 (Klass et al. 2000), Fibulin-1 und 2 (Argraves et al. 1990), Dystroglycan-1 (Henry and Campbell 1996), Thrombospondin-1 (Jaffe 1994), Versican (Wight 2002) und Fibronectin-1 (Gu et al. 2000) konnten nicht im nativen, jedoch im kultivierten equinen RPE nachgewiesen werden (Publikation, Tabelle 1; Proteine 53, 67, 81, 85, 86, 87, 108 und 112). Die Expression eines dieser differenziell exprimierten EZM-Proteine (Fibronectin-1) wurde weiter mittels PCR, Western Blot und immunzytochemisch validiert und auch das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse dieses Proteins konnte bestätigt werden (Publikation, Abb. 2, 3 und 4). Interessant wäre es zu untersuchen, ob die Expression von Fibronectin-1 bei kultivierten RPE-Zellen weiterhin nachweisbar wäre, wenn man equine RPE-Zellen, anders als bei dieser Studie, auf einer *in vitro* bereits vorhandenen EZM kultivieren würde. Unter den in dieser Studie vorherrschenden Kulturbedingungen war Fibronectin-1 jedoch ein EZM-Protein, anhand dessen differenzieller Expression man native differenzierte von kultivierten equinen RPE-Zellen nachweislich unterscheiden konnte.

Integrine interagieren mit Glykoproteinen der Basallamina, wie Laminin, Fibronectin und Kollagenen – diese sind Bestandteile der basal des RPE gelegenen Bruch-Membran (Aisenbrey et al. 2006, Afshari and Fawcett 2009). $\beta 1$ -Integrine bilden in Kombination mit verschiedenen α -Untereinheiten Heterodimere, die eine Bindungsspezifität zu bestimmten Proteinen der EZM aufweisen – so binden $\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 1$ - und $\alpha 7\beta 1$ -Integrine vornehmlich Laminin; $\alpha 4\beta 1$ -, $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha 8\beta 1$ -, $\alpha 9\beta 1$ - und $\alpha v\beta 1$ -Integrine zeigen hohe Affinität zu Fibronectin und $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 10\beta 1$ - sowie $\alpha 11\beta 1$ -Integrine binden hauptsächlich Kollagene (Stipp 2010). So ist erkennbar, dass vor allem $\beta 1$ -Integrine in Kombination mit verschiedenen α -Untereinheiten Bindungen mit den genannten Proteinen der EZM eingehen (Elner and Elner 1996). Möglich wäre, dass $\beta 1$ -Integrine bei der Spezies Pferd ebenfalls vornehmlich an die *in vivo*

vorhandenen EZM-Proteine binden, was eine Erklärung dafür wäre, dass das einzige Integrin, welches in den nativen equinen RPE-Zellen identifiziert wurde, CD29 (Integrin $\beta 1$) war (Publikation, Tabelle 1; Protein 4).

Die verstärkte Expression verschiedener Integrine im kultivierten equinen RPE könnte im direkten Zusammenhang mit der gleichzeitig erhöhten Expression der verschiedenen EZM-Proteine stehen, wie es bereits für die differenzielle Expression bestimmter Integrine bei RPE-Zellen des Menschen nachgewiesen wurde (Gullapalli et al. 2008). Außerdem sind Integrine nicht nur für die Adhäsion von Zellen an Komponenten der EZM verantwortlich, sondern spielen auch eine Rolle bei der Proliferation von Zellen (Brizzi et al. 2012). Bei Säugetieren findet nach der Geburt grundsätzlich keine Proliferation des RPE mehr statt, jedoch konnte gezeigt werden, dass altersbedingte Schäden und der Verlust einzelner RPE-Zellen von benachbarten Zellen durch Proliferation repariert werden können (Nagai and Kalnins 1996). Neuere Studien an RPE von Mäusen haben gezeigt, dass vor allem RPE aus der Peripherie des Augenhintergrundes die Fähigkeit zur Proliferation im adulten Auge beibehält und den altersbedingten Zellverlust des zentralen RPE durch Proliferation und Migration kompensiert (Kokkinopoulos et al. 2011). *In vitro* hingegen proliferieren RPE-Zellen bis sie konfluent sind und eine zusammenhängende epitheliale Schicht erreicht haben. Eine Studie an kultivierten RPE-Zellen des Menschen konnte zeigen, dass die Expression von Integrin- $\alpha 5 \beta 1$ von der Konfluenz der Zellen *in vitro* abhängt (Proulx et al. 2003). Subkonfluente bis konfluente Zellen haben auf mRNA- und Proteinebene deutlich mehr Integrin- $\alpha 5 \beta 1$ exprimiert als postkonfluente RPE-Zellen (Proulx et al. 2003). Als Grund wurde die vorhandene Proliferationsfähigkeit subkonfluenter bis konfluenter Zellen, im Gegensatz zu ruhenden postkonfluenten RPE-Zellen genannt (Proulx et al. 2003). Da die equinen RPE-Zellen in dieser Studie bei der Verwendung für die Versuche subkonfluent bis konfluent waren, könnte dies eine weitere Erklärung für die gesteigerte Expression der verschiedenen identifizierten Integrine des kultivierten equinen RPE darstellen.

Neben den beschriebenen Integrinen und EZM-Proteinen wurden noch weitere Membranproteine im kultivierten equinen RPE identifiziert, die vor allem eine große Rolle bei der Adhäsion von Zellen untereinander spielen - so zum Beispiel γ -Catenin, Cadherin-2 und 13, CD56 und CD54 (Publikation, Tabelle 1; Proteine 55, 56, 58, 74 und 75). Das γ -Catenin, auch bekannt als Plakoglobin, ist ein Protein, das durch eine

Interaktion mit klassischen Cadherinen Zellen untereinander verbindet – es stellt eine Verknüpfung zwischen einem Cadherin und α -Catenin her, welches wiederum den Komplex mit dem Actin-Zytoskelett einer Zelle verbindet (Trojanovsky et al. 1996, Witcher et al. 1996). Cadherin-2 stellt ein klassisches Cadherin, ein sogenanntes N-Cadherin dar (Kotb et al. 2011). Entsprechend unserer Daten des kultivierten equinen RPE wird N-Cadherin als dominierendes Cadherin bei RPE-Kulturen des Menschen beschrieben (Van Aken et al. 2003, Burke 2008). Cadherin-13 stellt ein nicht-klassisches Cadherin, ein sogenanntes T-Cadherin dar (Takeuchi et al. 2007, Ciatto et al. 2010). Cadherine vermitteln Ca^{2+} -abhängige interzelluläre Verbindungen (Halbleib and Nelson 2006) und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer zusammenhängenden epithelialen Schicht von RPE-Zellen (Burke 2008). Anders als *in vivo* findet *in vitro* eine starke Proliferation der equinen RPE-Zellen statt, um diese zusammenhängende Schicht auszubilden. Diese Proliferation der equinen RPE-Zellen unter Kulturbedingungen stellt eine mögliche Erklärung für die differenzielle Expression interzellulärer Adhäsionsmoleküle, wie der Cadherine dar. Die Expression von Cadherin-13 stellt zudem eine Besonderheit des equinen RPE dar, da es unseres Wissens nach bisher nur im RPE von Hühnern beschrieben wurde (Rizzolo et al. 2007).

CD56, das auch als neuronales Zelladhäsionsmolekül (N-CAM) bezeichnet wird (Lanier et al. 1991), ist ein weiteres Protein, welches ausschließlich im kultivierten equinen RPE detektiert wurde (Publikation, Tabelle 1; Protein 75). Wie anhand der RPE-Zellen von Ratten gezeigt werden konnte wird CD56 *in vivo* apikal, zur retinalen Seite des RPE exprimiert, was eine enge Verbindung zwischen dem RPE und den Photorezeptoren begünstigt (Gundersen et al. 1993, Marmorstein et al. 1998b). Bei kultivierten RPE-Zellen der Ratte und der Zelllinie RPE-J hingegen wurde eine basolaterale Expression von CD56 beschrieben (Gundersen et al. 1993, Nabi et al. 1993), was für eine kulturbedingte Umverteilung des Proteins spricht. Es ist möglich, dass interzelluläre Interaktionen von CD56-Molekülen benachbarter RPE-Zellen (homotypisch) oder Interaktionen von CD56-Molekülen mit Proteinen der EZM basal des RPE (heterotypisch) für die Umverteilung der Expression verantwortlich sind (Marmorstein et al. 1998b). Daher könnte die Expression bei kultivierten equinen RPE-Zellen auf eine kulturbedingt gesteigerte Expression von CD56 zurückzuführen sein, die zum Ziel hatte, proliferierende equine RPE-Zellen miteinander zu verbinden

oder ihre Bindung an die EZM zu stärken, um eine stabile epitheliale Zellschicht zu erzeugen.

Als weiteres wichtiges Adhäsionsmolekül wurde CD54, auch bekannt als interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) im kultivierten equinen RPE identifiziert (Publikation, Tabelle 1; Protein 74). Es handelt sich dabei um ein Glykoprotein, welches in der Zellmembran lokalisiert ist und an Zell-zu-Zell- sowie Zell-zu-Matrix-Verbindungen beteiligt ist (Chen C. L. et al. 2012). Interessant ist die Tatsache, dass CD54 mit verschiedenen Bindungspartnern wie beispielsweise Leukozyten-ständigen Integrinen interagiert, was zu einer Aktivierung der Leukozyten führt und eine transendotheliale Migration dieser induzieren kann (Roebuck and Finnegan 1999). Als hauptsächlicher Bindungspartner für CD54 auf Oberflächen von Leukozyten wird das Integrin LFA-1 (Lymphozyten funktions-assoziiertes Antigen 1) beschrieben (Smith et al. 2003, Smith et al. 2007). Die Rolle von CD54 bei der experimentellen autoimmunen Uveitis im Maus- und Rattenmodell wurde in der Vergangenheit untersucht (Whitcup et al. 1993, Uchio et al. 1994). In beiden Modellen, bei denen Uveitis entweder mit IRBP bei B10.A Mäusen, oder mit S-Ag bei Lewis-Ratten induziert werden konnte, wurde der klinische Verlauf der Uveitis nach intraperitonealer Gabe von Antikörpern gegen CD54 und LFA-1 in bestimmten Zeiträumen beobachtet (Whitcup et al. 1993, Uchio et al. 1994). Zusätzlich zu der klinischen Beurteilung von Symptomen wurden Augen einzelner Tiere histologisch untersucht. In beiden Studien konnten intraokuläre Entzündungssymptome bei den Antikörper-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert oder unterdrückt werden (Whitcup et al. 1993, Uchio et al. 1994). In späteren Studien konnte bei experimentell ausgelöster Uveitis der Maus eine hochregulierte Expression von CD54 in retinalen Gefäßen gezeigt werden, in dessen Zusammenhang es zum Zusammenbruch der BRS und einer erhöhten Durchlässigkeit von Leukozyten durch retinale Gefäße kam (Xu et al. 2003). Eine weitere Studie zur Transmigration von Leukozyten an einem Modell der Blut-Hirn-Schranke konnte zeigen, dass Leukozyten (vor allem neutrophile Granulozyten) nach Stimulation mit TNF α und Streptokokken die epitheliale Barriere überwinden konnten (Wewer et al. 2011). Auch bei dieser Studie konnte eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD54 in den epithelialen Zellen des Barrieremodells gezeigt werden (Wewer et al. 2011). Im RPE der Ratte wurde CD54 ebenfalls nachgewiesen

und eine Beteiligung von CD54 und LFA-1 bei der Transmigration von Leukozyten durch die äußere BRS demonstriert (Devine et al. 1996). Dabei wurden T-Lymphozyten von S-Ag-immunisierten Ratten auf RPE-Kulturen gesetzt und die Transmigration dieser Leukozyten durch das RPE mit Hilfe eines Transmissions-Elektronen-Mikroskops erfasst (Devine et al. 1996). Die Transmigrationsrate durch das RPE konnte mittels Präinkubation der Leukozyten mit einem Antikörper gegen LFA-1 und des RPE mit einem Antikörper gegen CD54 deutlich reduziert werden (Devine et al. 1996). Alle diese bisherigen Erkenntnisse verdeutlichen, dass CD54 und dessen Interaktionen mit LFA-1 auf Leukozytenoberflächen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen haben und somit auch bei der ERU wichtig sein könnten. Gezielte Untersuchungen zur Expression dieses Proteins im RPE von an ERU erkrankten Pferden und die Expression seines Bindungspartners auf Leukozyten betroffener Tiere könnten eine mögliche Beteiligung dieses Adhäsionsmoleküls an der Entwicklung der ERU zeigen. Zudem könnten erste Erkenntnisse zur Rolle von LFA-1 und CD54 bei der ERU beispielsweise mittels Transmigrationsassays von Leukozyten durch equine RPE-Zellen gewonnen werden. Dabei könnte man equine Leukozyten und RPE-Zellen zu einer erhöhten Expression von LFA-1 bei Leukozyten und CD54 bei RPE-Zellen stimulieren und untersuchen, ob daraufhin eine verstärkte Transmigration zu beobachten ist.

Die vergleichende proteomische Analyse des nativen und kultivierten equinen RPE lieferte viel Aufschluss über die Expression verschiedener Proteine aus zwei unterschiedlichen Zell-Zuständen (nativ und kultiviert). Mit Hilfe der vorangestellten Anreicherung von Membranproteinen (84% der 112 identifizierten Proteine waren Membranproteine) wurde eine Liste von Proteinen generiert, wie sie bisher für das equine RPE nicht vorhanden war. Durch den Einsatz weiterer Methoden wie der PCR, des Western Blot und der immunzytochemischen Analyse konnten die Ergebnisse für einzelne ausgewählte Proteine (CRALBP, RPE65, CD49c und Fibronectin-1) zusätzlich zur massenspektrometrischen Analyse validiert werden. Dadurch ist es gelungen Markerproteine festzulegen, die unter gleichen Kulturbedingungen native differenzierte deutlich von kultivierten equinen RPE-Zellen abgrenzen konnten. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine equine RPE-Zelllinie zu kultivieren und zu charakterisieren, um damit zukünftige funktionelle Studien zur

Rolle des RPE bei der Pathogenese der ERU zu ermöglichen.

Da laut Definition der Tissue Culture Association (heute: Society for In Vitro Biology) eine Primärkultur ab dem Zeitpunkt ihrer ersten Passage als Zelllinie bezeichnet wird (Schaeffer 1990) erfüllte die hier untersuchte equine RPE-Kultur mit dem Namen eqRPE1 diese Voraussetzung und ist unseres Wissens nach damit die erste charakterisierte und publizierte equine RPE-Zelllinie weltweit. Ist der Status der jeweiligen Zelllinie bekannt kann man diese weiter als endliche oder permanente Zelllinie klassifizieren (Schaeffer 1990). Permanente Zelllinien können entweder spontan entstehen, so wie es bei den humanen RPE-Zelllinien K-1034 und D407 geschah (Kigasawa et al. 1994, Davis et al. 1995), oder sie können, wie im Fall der humanen hTERT-RPE-Zellen, der murinen RPET-Zellen oder RPE-J-Zellen aus der Ratte, durch biotechnologische Verfahren zu permanenten Zelllinien entwickelt werden (Nabi et al. 1993, Kato et al. 1996, Rambhatla et al. 2002). Noch ist abzuwarten, ob die in dieser Studie beschriebene equine RPE-Zelllinie eqRPE1, die ohne den Einsatz biotechnologischer Verfahren zur Immortalisierung kultiviert wurde, sich zu einer spontanen permanenten Zelllinie entwickeln wird. EqRPE1 hat bis zu diesem Zeitpunkt (März 2013) 26 Passagen durchlaufen. Die gute Proliferations- und Teilungsfähigkeit deutet bisher auf keine Seneszenz der Zellen hin. Daher können die Zellen vervielfältigt werden und somit für zahlreiche funktionelle Versuche unter verschiedenen experimentellen Konstellationen verwendet werden.

Der in dieser Studie durchgeführte Vergleich nativer equiner RPE-Zellen mit der Zelllinie eqRPE1 hat gezeigt, dass die Zusammenstellung der Proteine der Zelllinie sich durch die Kultivierung gegenüber dem Proteom nativer equiner RPE-Zellen verändert hat. Natives equines RPE exprimiert, anders als eqRPE1, weiterhin viele Proteine, die sehr spezifische Funktionen von RPE *in vivo* widerspiegeln. Hier sind zum Beispiel Proteine zu nennen, die eine wichtige Aufgabe im Retinalzyklus des RPE verfolgen, wie CRALBP, RPE65 und RDH5 (Huang et al. 2009). Ebenfalls zu nennen sind in diesem Zusammenhang CD107a und CD107b, Proteine, die bei Bildung von Phagolysosomen und somit bei der Phagozytose des RPE eine Rolle spielen (Chen P. M. et al. 2011). Außerdem exprimiert nur natives equines RPE MCT1 als spezifisches Transportprotein für Laktat (Philp et al. 2003b) und Kir7.1 ein K⁺-Kanalprotein des RPE verschiedener Säugetiere (Yang et al. 2008b).

Die Expression dieser Proteine im kultivierten equinen RPE setzt womöglich das

Vorhandensein einer intakten Retina als funktionelle Struktur voraus, wie es unter Kulturbedingungen nicht geboten wird. In gewisser Weise stellen Kulturbedingungen einen pathologischen Zustand des Auges dar, bei dem das RPE keine modulierenden Signale mehr von der Retina empfängt (Rizzolo et al. 2011). Ohne der apikal des RPE gelegenen Retina gibt es beispielsweise keine Retinoide, die enzymatisch re-isomerisiert werden müssen und somit ist anzunehmen, dass Proteine des Retinalzyklus (CRALBP, RPE65, RDH5) unter Kulturbedingungen größtenteils überflüssig werden. Gleiches gilt womöglich für Proteine, die *in vivo* an der Phagozytose abgestoßener Segmente von Photorezeptoren beteiligt sind (CD107a und b), oder aufgrund des hohen metabolischen Umsatzes der Retina anfallendes Laktat abtransportieren müssen (MCT1). Unter Kulturbedingungen fehlt apikal des RPE in Form der Retina ein hoch organisiertes neuronales Gewebe (Masland 2012), deren einzelne neuronale Zellen über exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter, wie Taurin, Glycin und GABA miteinander kommunizieren (Miller 2008) - folglich könnte dies die fehlende Expression von Transportproteinen für Neurotransmitter im equinen RPE unter Kulturbedingungen erklären. Der Verlust der Expression bestimmter Proteine durch Kultivierung und die damit verbundene Dedifferenzierung spiegelt jedoch keine Exklusivität des equinen RPE wieder, sondern ist typisch für kultivierte RPE-Zellen, sowie Zelllinien (Campochiaro and Hackett 1993, Hamel et al. 1993, Alge et al. 2003, Alge et al. 2006, Ahmado et al. 2011). Oft werden CRALBP und RPE65 wie bei der Ratten-Zelllinie RPE-J nicht exprimiert (West et al. 2001), oder es wird wie bei der humanen RPE-Zelllinie hTERT-RPE und der murinen Zelllinie B6-RPE07 nur CRALBP als Markerprotein nachgewiesen (Rambhatla et al. 2002, Chen M. et al. 2008). Neben CRALBP und RPE65 wurde bei der Ratten-Zelllinie RPE-J auch die Expression von 11-cis Retinol Dehydrogenase (dazu gehört RDH5) untersucht (West et al. 2001). Auch die Expression dieses Proteins konnte nicht nachgewiesen werden und folglich wurden RPE-J-Zellen von den Autoren als nicht angemessen für Retinalzyklus-assoziierte Experimente beschrieben (West et al. 2001).

CRALBP und RPE65 sind normalerweise spezifische Proteine differenzierter nativer RPE-Zellen, so auch des in dieser Studie untersuchten nativen equinen RPE. Deswegen werden CRALBP und RPE65 auch als Differenzierungsmarker von RPE-Zellen *in vitro* angesehen (Steindl-Kuscher et al. 2009, Ahmado et al. 2011). Es

besteht daher großes Bestreben danach, RPE-Zellen zu kultivieren und Zelllinien zu entwickeln, die RPE65 und CRALBP als Differenzierungsmarker exprimieren. ARPE-19 stellt als seltene Ausnahme eine solche Zelllinie dar, welche beide Markerproteine exprimiert (Dunn et al. 1996). Dies ist unter anderem der Grund dafür, warum ARPE-19 eine solche Popularität als RPE-Zelllinie in der Forschung genießt.

Die Auswertung der identifizierten Proteine der equinen RPE-Zelllinie eqRPE1 hat gezeigt, dass eqRPE1 gegenüber nativem equinen RPE dedifferenzierte und es lässt sich deutlich erkennen, dass adhäsions-assoziierte Proteine (Integrine, EZM-Proteine, Zelladhäsionsmoleküle) in den Vordergrund traten – möglicherweise aufgrund der *in vitro* fehlenden EZM in Form der basal gelegenen Bruch-Membran. Eine Verschiebung zu solchen Proteinen konnte bei der Untersuchung der Gene Ontology (GO) im Hinblick auf biologische Prozesse identifizierter Proteine demonstriert werden (Publikation, Abb. 1; A und B). Dabei war im kultivierten RPE ein deutlicher Rückgang von Proteinen zu verzeichnen, die nach GO Transportfunktionen als biologischen Prozess verfolgen (Publikation, Abb. 1; A und B). Hingegen war ein deutlicher Anstieg von Proteinen erkennbar, deren biologische Funktion nach GO die Zell-Adhäsion ist. Zusätzlich stieg die Expression von Proteinen mit Zell-Kommunikations-Funktion in kultivierten RPE-Zellen an und ging proportional mit der biologischen Funktion der Zell-Adhäsion einher. Auffallend war, dass das Verhältnis beider Prozesse in nativen und kultivierten Zellen gleich geblieben ist. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Zell-Adhäsion und Zell-Kommunikation essenziell für den Erhalt eines zellulären Phänotyps sind (Morley et al. 2010), egal ob es sich um native oder kultivierte Zellen handelt. Die Ergebnisse decken sich mit jenen einer Studie an RPE-Zellen des Menschen, bei der die Proteinexpression von nativen und kultivierten humanen RPE-Zellen auch massenspektrometrisch untersucht und verglichen wurde (Alge et al. 2003). Dabei wurde festgestellt, dass kultiviertes RPE des Menschen ebenfalls dedifferenzierte und eine fehlende Expression von Proteinen mit spezifischen RPE-Funktionen (zum Beispiel CRALBP und RPE65) zeigte, wohingegen Proteine, die im Zusammenhang mit Adhäsion und Formerhalt der Zelle stehen verstärkt exprimiert wurden (Alge et al. 2003).

Die Dedifferenzierung des kultivierten equinen RPE konnte zudem morphologisch gesehen werden. Natives equines RPE war im Gegensatz zur equinen RPE-Zelllinie

eqRPE1 pigmentiert (Publikation, Abb. 4; A und F). Melanin und Lipofuscin sind die beiden Hauptpigmente des RPE (Dontsov et al. 1999, Zhang X. et al. 2011). Melanin hat eine protektive Rolle im RPE und schützt als Antioxidans Zellen vor photooxidativem Stress (Sarna et al. 2003, Zhang X. et al. 2011). Lipofuscin stellt im RPE hingegen ein Nebenprodukt bei der Phagozytose äußerer Segmente von Photorezeptoren dar und akkumuliert im Laufe des Alterungsprozesses der Retina innerhalb des RPE (Zhang X. et al. 2011). Der Verlust der Pigmentierung bei RPE-Zellen unter Kulturbedingungen stellt ein bekanntes Phänomen dar (Engelmann and Valtink 2004, Ahmado et al. 2011) und wurde bereits früh in Kulturen von Hühner-RPE-Zellen gezeigt (Whittaker 1963). Als Ursache für den Verlust der Pigmentierung kultivierter RPE-Zellen wird das Fehlen des Enzyms Tyrosinase beschrieben (Biesemeier et al. 2010). Tyrosinase ist ein regulatorisches Schlüsselenzym bei der Produktion von Melanin und somit bei der Pigmentation kutaner Zellen der Haut (Bae-Harboe and Park 2012), aber auch des RPE (Reinisalo et al. 2012). Im Gegensatz zur Haut wird Melanin im RPE nur pränatal synthetisiert und lebenslang in sogenannten Melanosomen gespeichert (Biesemeier et al. 2010, Reinisalo et al. 2012). Daher dünnt *in vitro* mit jeder Passage das Melanin in den RPE-Zellen aus und es wird kein neues nachgebildet (Ahmado et al. 2011). Dieses Phänomen konnte auch bei den kultivierten equinen RPE-Zellen beobachtet werden, wo Zellen der Passage 4 bereits depigmentiert waren. Bei der humanen Zelllinie ARPE-19 wurde von Pigmentierung der kultivierten Zellen bei der Erstbeschreibung berichtet (Dunn et al. 1996). In neueren Studien konnte unter vergleichbaren Kulturbedingungen jedoch keine Pigmentierung der ARPE-19-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen nach Veränderung des verwendeten Mediums von DMEM/F12 (1:1) hin zu DMEM mit Pyruvat die Pigmentierung von ARPE-19 re-induziert werden konnte (Ahmado et al. 2011). Eine verstärkte Pigmentierung aufgrund Pyruvats wurde bereits früher auch bei anderen Zellen wie zum Beispiel kultivierten Melanomzellen beschrieben (Nakayasu et al. 1977). Der zugrundeliegende Mechanismus dieses Effekts von Pyruvat wird jedoch bislang noch untersucht (Ahmado et al. 2011).

Jegliches Verbringen nativer RPE-Zellen in ein künstliches Umfeld verändert das morphologische und funktionelle Verhalten dieser Zellen (Karl et al. 2007). Folglich besteht in der Forschung großes Interesse an Zellen und Zelllinien mit möglichst

übereinstimmenden Charakteristika zu nativen Zellen. So gibt es zum Beispiel vergleichende Studien zwischen humanen fötalen RPE-Zellen (fhRPE) und ARPE-19, die der Frage nachgingen, welche der untersuchten Zellen nativem RPE ähnlicher sind (Ablonczy et al. 2011, Kannan et al. 2011). Dabei wurde anhand der Messung transepithelialer Widerstände von fhRPE und ARPE-19 gezeigt, dass fhRPE deutlich höhere Widerstände erzielte als ARPE-19 (Ablonczy et al. 2011). Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass fhRPE im Vergleich zu ARPE-19 deutlich mehr CRALBP und RPE65 exprimiert (Ablonczy et al. 2011). Des Weiteren wurde die Sekretion von VEGF und PEDF zwischen fhRPE und ARPE-19 verglichen und festgestellt, dass die Sekretion dieser beiden Faktoren bei fhRPE mehr dem Sekretionsmuster von RPE-Zellen *in vivo* entsprach, als bei ARPE-19 (Ablonczy et al. 2011). So schließen die Autoren aus dieser Studie, dass fhRPE ein überlegeneres Kulturmodell nativer RPE-Zellen darstellt als ARPE-19 (Ablonczy et al. 2011). Jedoch ist es wichtig zu erwähnen, dass selbst das Kulturmedium, indem Zellen gehalten werden einen großen Einfluss auf kultivierte Zellen haben kann, wie bereits bei der Pigmentierung von ARPE-19 in verschiedenen zusammengesetzten Kulturmedien gezeigt wurde (Ahmado et al. 2011). Eine vergleichende Studie zwischen nativen humanen RPE-Zellen und der Zelllinie ARPE-19 unter verschiedenen Kulturbedingungen (konfluent, subkonfluent, mit Serum, ohne Serum) konnte dies ebenfalls verdeutlichen (Tian et al. 2005). Dabei wurde festgestellt, dass ARPE-19-Zellen, die in serumfreiem Medium gehalten wurden, nativen Zellen am ähnlichsten waren (Tian et al. 2005). In einer weiteren Studie wurde die Phagozytosefunktion von Virus-transfizierten RPE-Zellen des Menschen in unterschiedlichen Kulturmedien untersucht (Karl et al. 2007). Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass verschiedene Kulturmedien unterschiedliche Auswirkungen auf die Phagozytosefunktion des RPE haben (Karl et al. 2007). Neben dem verwendeten Kulturmedium kann aber auch der Untergrund, auf dem RPE-Zellen kultiviert werden, Einfluss auf die Proteinexpression von Zellen nehmen. Bei einer spontan immortalisierten bovinen RPE-Zelllinie (tRPE), die auf einer EZM kornea-endothelialen Ursprungs kultiviert wurde, konnte eine CRALBP- und RPE65-Expression mittels PCR und immunzytochemisch nachgewiesen werden, wohingegen nach Kultivierung auf Kunststoff CRALBP deutlich herunterreguliert und RPE65 nicht nachweisbar war (Liggett et al. 2009). In einer anderen Studie wurden

humane RPE-Zellen entweder auf Kunststoff oder auf humanen Amnionmembranen kultiviert (Akrami et al. 2011). Anschließend wurde vergleichend die Expression von CRALBP, RPE65, CD68, VEGF und Tyrosinase mittels PCR ermittelt (Akrami et al. 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den Kunststoff-kultivierten Zellen bei den Amnionmembran-kultivierten RPE-Zellen die Expression von CRALBP und Tyrosinase unverändert blieb, jedoch die Expression von RPE65, CD68 und VEGF deutlich angestiegen war (Akrami et al. 2011). Die Folgerung der Autoren war, dass eine Kultivierung auf Amnionmembranen einer Dedifferenzierung humaner RPE-Zellen unter Kulturbedingungen entgegenwirkte (Akrami et al. 2011). Vergleiche und Interpretationen von Daten verschiedener Laboratorien müssen daher kritisch betrachtet werden (Luo et al. 2006), auch wenn scheinbar gleiche Zellen (zum Beispiel humane RPE-Zellen) oder sogar Zelllinien wie ARPE-19 verwendet werden. Verschiedene Faktoren bei der Kultivierung equiner RPE-Zellen, wie zum Beispiel der Untergrund der kultivierten Zellen, oder das Medium in dem die Zellen gehalten worden sind, waren wahrscheinlich ebenso für die Dedifferenzierung von eqRPE1 verantwortlich. Wie gezeigt werden konnte, kann bei Zelllinien die Ausprägung differenzierter Merkmale nativer Zellen durch Veränderungen der Kulturbedingungen induziert werden (Tian et al. 2005, Ahmado et al. 2011). Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und bietet daher in Zukunft die Möglichkeit durch Veränderung des Kulturmediums, durch Zusatzstoffe im Kulturmedium oder durch Erprobung verschiedener Substrate (zum Beispiel Kultivierung auf verschiedenen extrazellulären Matrices) Einfluss auf den Differenzierungsgrad der Zelllinie eqRPE1 zu nehmen und ihr dadurch Bedingungen zu schaffen, welche die Expression von Merkmalen nativer equiner RPE-Zellen zulässt, wie zum Beispiel die Pigmentation oder die Expression von CRALBP und RPE65.

Obwohl Zelllinien kultur-bedingte Unterschiede erfahren bieten sie gegenüber nativen Zellen viele Vorteile, wie die jahrelange Verfügbarkeit von charakterisierten Zellen gleicher Passage in Zellbanken, sowie die Zugänglichkeit zu Zellen, die nativ nur unter hohen finanziellen und zeitlichen Verlusten zu gewinnen wären (Hay et al. 1996). Außerdem sind Versuche an Zelllinien im Allgemeinen beliebig oft und unter verschiedenen experimentellen Konstellationen durchführbar. Zudem stellt die Verfügbarkeit gesunder Spenderaugen mit kurzen post-mortem Zeiten bei der Benutzung primärer humaner RPE-Zellen einen limitierenden Faktor dar

(Proulx et al. 2004). So ist man bei der Forschung häufig auf die Verwendung etablierter Zelllinien wie ARPE-19 angewiesen. Aufgrund der guten Verfügbarkeit enukleierter Augen von augengesunden Schlachtpferden mit kurzen post-mortem Zeiten besteht für uns die Möglichkeit, primäre RPE-Zellen für bestimmte Fragestellungen bei der Forschung (zum Beispiel die Suche nach differenziell regulierten Proteinen bei RPE-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Tiere, aber auch Fragen zur physiologischen Funktion) häufig zu nutzen. Die Arbeit mit primären equinen RPE-Zellen stellt jedoch auch eine zeitintensive Präparation und Isolation der nativen RPE-Zellen voraus. In diesem Fall stellen gut charakterisierte, sich teilende, speziesspezifische Zelllinien, wie eqRPE1 einen großen Vorteil dar. Unter der Voraussetzung gleicher Kulturbedingungen, ist zudem die Vergleichbarkeit generierter Daten zwischen Laboratorien welche Zelllinien nutzen besser, als zwischen solchen, die mit primären Zellen arbeiten.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass equine RPE-Zellen unter Kulturbedingungen ebenfalls dedifferenzieren und ihr Zelloberflächenproteom sich grundlegend verändert. Nichtsdestotrotz stellt die equine RPE-Zelllinie eqRPE1 eine bisher nicht dagewesene speziesspezifische Zelllinie für die Forschung zur Funktion von RPE-Zellen des Pferdes dar. Aufgrund ihres ausgesprochen guten Teilungspotenzials und der Expression vieler verschiedener Adhäsions-Moleküle (Integrine, EZM-Proteine und Zelladhäsionsmoleküle) kann sie ein hervorragendes Modell der äußeren BRS des Pferdes darstellen. Sie ist für zahlreiche funktionelle Studien zur Integrität der Barrierestruktur bestens geeignet und bietet die Möglichkeit der vielfachen Reproduzierbarkeit von Versuchen unter verschiedenen experimentellen Voraussetzungen und Konstellationen. Dabei können die Zellen beispielsweise auf speziellen porösen Filtersystemen, sogenannten Transwell-Inserts, kultiviert werden. Zwei Kompartimente (apikal und basal) und die dazwischen befindliche RPE-Barriere simulieren hierbei die physiologische Lage der äußeren BRS des Pferdes *in situ*. Dieses Modell ermöglicht zum Beispiel hypothesenbasierte Studien zur Interaktion und Transmigration veränderter Leukozyten durch die äußere BRS, wie es bei an ERU erkrankten Tieren vermutet wird. Des Weiteren können unter Verwendung dieses Barrieremodells Versuche durchgeführt werden, bei denen zum Beispiel equine RPE-Zellen mit Glaskörpern oder mit Seren gesunder und an ERU erkrankter Tiere inkubiert werden. So könnten womöglich bisher unbekannt Informationen

darüber gewonnen werden, ob dadurch eine unphysiologische Durchlässigkeit der Schranke erreicht werden kann und ob Signale, die eine Transmigration von Entzündungszellen durch die Barriere begünstigen, von der Blutseite des RPE oder der retinalen Seite zu erwarten sind.

Jedoch gibt es auch Limitationen bei der Verwendung der Zelllinie, wie beispielsweise bei Versuchen, bei denen die Proteinexpression von RPE-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde verglichen werden soll (vergleichende Proteomanalytik). Da das Proteom dynamisch ist und sich mit dem physiologischen Zustand der Zelle verändert (Alge et al. 2003, Apweiler et al. 2009), also auch bei pathologischen Zuständen, könnte die vergleichende Proteomanalytik viele Informationen über differenziell regulierte Proteine der untersuchten Zellen liefern. Um Informationen über krankheitsbedingte Veränderungen in der Proteinexpression erkennen zu können, wird die Verwendung nativer Zellen, deren Proteom sich nicht bereits kulturbedingt verändert hat, vorausgesetzt. Deswegen ist in diesem Fall die Verwendung nativer equiner RPE-Zellen der equinen Zelllinie eqRPE1 vorzuziehen.

Anders als im Bereich der Humanmedizin, wo primäre RPE-Zellen von Spendern mit kurzen post-mortem Zeiten einen limitierenden Faktor darstellen (Proulx et al. 2004), ist die Verfügbarkeit von enukleierten Augen gesunder Schlachtpferde mit kurzen post-mortem Zeiten in der Veterinärmedizin gut und stellt eine für diese Zwecke wertvolle Quelle nativer equiner RPE-Zellen dar, die keine kulturbedingten Merkmalsveränderungen erfahren haben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eqRPE1 eine bisher einzigartige Linie equiner RPE-Zellen darstellt, anhand welcher die äußere BRS des Pferdes *in vitro* studiert werden kann. Aufgrund der guten Proliferations- und Teilungsfähigkeit, sowie der Expression einer großen Anzahl von Adhäsionsmolekülen ist eqRPE1 in der Lage, eine stabile epitheliale Barriere aufzubauen und kann entsprechend für Versuche, wie Transmigrationsassays, die eine funktionelle Barriere voraussetzen, verwendet werden. Kulturbedingungen haben einen großen Einfluss auf den Differenzierungsgrad einer Zelllinie (Tian et al. 2005, Karl et al. 2007, Ahmado et al. 2011). Dies konnte auch in dieser Studie anhand des Vergleiches zwischen nativen und kultivierten RPE-Zellen gezeigt werden. Die mittels vier Methoden verifizierte Expression von CRALBP und RPE65 zeichnete eindeutig native equine RPE-Zellen aus, wohingegen CD49c und Fibronectin-1 bei kultivierten, jedoch nicht bei nativen

RPE-Zellen des Pferdes nachgewiesen werden konnten. Aufgrund der differentiellen Expression dieser Proteine, die entweder nur bei nativen (CRALBP, RPE65) oder ausschließlich bei kultivierten Zellen (CD49c, Fibronectin-1) nachweisbar waren, können diese Proteine hervorragend als Marker verwendet werden, die unter den gleichen Kulturbedingungen, native equine RPE-Zellen deutlich von kultivierten RPE-Zellen des Pferdes unterscheiden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine entzündliche Augenerkrankung bei Pferden, die mit einer Prävalenz von circa 10% weltweit die häufigste Ursache für den Verlust des Sehvermögens dieser Tiere darstellt. Bei der Pathogenese handelt es sich um ein immun-mediertes Geschehen, bei dem aktivierte T-Lymphozyten die äußere Blut-Retina-Schranke (BRS) überwinden und wichtige intraokuläre Strukturen zerstören. Gekennzeichnet wird die ERU von wiederkehrenden Entzündungsschüben, was sie zum einzigen spontanen Tiermodell der autoimmunen Uveitis des Menschen macht.

Die BRS besteht aus zwei Anteilen, einer inneren und einer äußeren BRS. Die innere BRS wird von Endothelzellen retinaler Gefäße, die äußere vom retinalen Pigmentepithel (RPE) gebildet. Endothel- und RPE-Zellen werden von interzellulären Verbindungen (Tight-Junctions) eng zusammengehalten und bilden daher eine funktionelle Barriere zwischen der Blutseite und der retinalen Seite des Auges. Da bei der ERU die äußere BRS von den Entzündungszellen transmigriert wird, ist es wichtig, diesen zentralen Mechanismus der Entzündung zu verstehen. Für spätere funktionelle Studien zur Rolle der äußeren BRS war es das Ziel dieser Studie, eine Linie equiner RPE-Zellen zu kultivieren und ihre Proteinexpression mit nativen physiologischen RPE-Zellen zu vergleichen. Für diese Arbeit wurden daher native und kultivierte equine RPE-Zellen der Passage 4 proteomisch untersucht und die exprimierten Proteine beider Zellzustände miteinander verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass native Zellen Proteine exprimierten, die bekannte spezifische Funktionen des RPE erfüllen, wie zum Beispiel die Proteine des Retinalzyklus RDH5, CRALBP und RPE65, oder Transportproteine, wie MCT1 für Laktat, oder Kir7.1 als Transporter für K^+ . Die Expression dieser Proteine war in equinen RPE-Zellen der Passage 4 nicht nachweisbar, hingegen exprimierten sie viele Proteine, die mit biologischen Funktionen wie Proliferation, Kommunikation und Zell-Adhäsion assoziiert sind – hierzu zählen die Integrine, Proteine der extrazellulären Matrix (unter anderem Adhican, Syndecan-2, Thrombospondin-1 und Fibronectin-1), sowie Zelladhäsionsmoleküle wie beispielsweise CD54 und CD56. Aufgrund der nachgewiesenen differentiellen Expression von CRALBP und RPE65 nur bei nativem RPE, sowie CD49c und Fibronectin-1 nur bei kultivierten Zellen

können diese Proteine unter gleichen Kulturbedingungen als verlässliche Marker zur Unterscheidung von nativen und kultivierten equinen RPE-Zellen verwendet werden. Zu den Proteinen, die in beiden Zellzuständen (nativ und Passage 4) identifiziert wurden, zählen unter anderem sechs Zytokeratine, drei Na⁺/K⁺ ATPasen, ein Integrin (CD29), Basigin, sowie das Glukosetransportprotein GLUT1.

Im Rahmen dieser Studie ist es gelungen, eine equine RPE-Zelllinie (eqRPE1) zu etablieren. Diese Zellen proliferieren und sind in der Lage, in kurzer Zeit eine epitheliale Schichtkultur zu bilden. Das macht eqRPE1 zu einem sehr guten Modell für funktionelle Studien, die einer solchen epithelialen Barriere bedürfen. Die Vorteile dieser Linie sind die Teilungs- und Proliferationsfähigkeit, die eine hohe Anzahl an Versuchen unter verschiedenen experimentellen Konstellationen ermöglicht, sowie die Fähigkeit der Zelllinie eine stabile Barriere auszubilden, die sie zu einem wertvollen Spezies-spezifischen Modell der äußeren BRS macht. Aufgrund der kulturbedingten proteomischen Dedifferenzierung der Zelllinie sollten für zukünftige Studien zu Veränderungen des RPE bei der ERU native equine RPE-Zellen verwendet werden (zum Beispiel bei der differentiellen Proteomanalyse gesunder und kranker RPE-Zellen). Die Zelllinie hingegen eignet sich aufgrund der Ausbildung einer Barriere bestens für Hypothesen-basierte Studien zur Transmigration von Leukozyten durch das equine RPE (Transmigrations-Assays).

6 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is an inflammatory ocular disease in horses with a prevalence of about 10% and is the main cause for loss of vision in these animals world-wide. Pathogenesis of the disease is immune-mediated with activated T-lymphocytes passing the outer blood-retinal-barrier (BRB) and subsequently destroying important intraocular structures. Spontaneously recurring episodes of inflammation are characteristic which makes ERU the only spontaneous model for autoimmune uveitis in human beings.

The BRB consists of two structures, an inner and an outer BRB. The inner BRB is formed by endothelial cells of retinal vessels, the outer BRB by retinal pigment epithelial (RPE) cells. Endothelial and RPE cells are tightly held together by intercellular tight-junctions and therefore form a functional barrier between the blood side and the retinal side of the eye. As inflammatory cells transmigrate through the outer BRB in ERU it is of great importance to understand this key mechanism of inflammation. In order to perform functional studies on the outer BRB in the future, the aim of this study was to generate a line of equine RPE cells and to compare their proteomic expression profile to native physiological RPE cells. In this study, equine native RPE and RPE of passage 4 were analyzed with proteomics and proteins expressed by these two states of cells were compared.

It was shown that native equine RPE expressed proteins with known RPE-specific functions like the visual cycle proteins RDH5, CRALBP and RPE65 or transport-proteins such as MCT1 which is a transporter for lactate or Kir7.1, a transporter for potassium. Expression of these proteins was not detectable in passage-4 RPE. Instead, these cells expressed many proteins which were associated with biological functions as proliferation, communication and cell-adhesion – namely integrins, extracellular matrix proteins (among others adlcan, syndecan-2, thrombospondin-1 and fibronectin-1), as well as cell-adhesion molecules CD54 and CD56. Due to differential expression of CRALBP and RPE65 which were restricted to native equine RPE and CD49c and fibronectin-1, only expressed by cultivated equine RPE, these proteins could be used as markers to distinguish native from cultivated equine RPE, under the same culture conditions. Among the latter of proteins which were concurrently expressed by both cell states (native and passage-4) were six

cytokeratins, three Na⁺/K⁺ ATPases, an integrin (CD29), basigin and a transporter for glucose (GLUT1).

In the course of this study, we succeeded in establishing an equine RPE cell-line (eqRPE1). These cells proliferate and are able to form an epithelial monolayer within a short amount of time. This makes eqRPE1 a very good model for functional studies which require an epithelial barrier. Hence, the advantage of this cell-line is the capability to multiply and to proliferate, which allows performing numerous experiments with different experimental setups. Furthermore, ability of forming a tight epithelial barrier makes eqRPE1 a valuable species-specific model of the outer BRB. Due to culture associated dedifferentiation of the cell-line, future studies addressing ERU-associated differences in equine RPE should be performed with native RPE cells (for example differential proteomic analysis of RPE cells of healthy and ERU-diseased horses). On the other hand, due to the capability of forming a barrier, the cell-line can be used for studies on transmigration of leukocytes through equine RPE (transmigration-assays).

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ablonczy Z., Dahrouj M., Tang P. H., Liu Y., Sambamurti K., Marmorstein A. D. and Crosson C. E. (2011). Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(12): 8614-8620.
- Afshari F. T. and Fawcett J. W. (2009). Improving RPE adhesion to Bruch's membrane. *Eye (Lond)* **23**(10): 1890-1893.
- Agrawal S. M., Silva C., Tourtellotte W. W. and Yong V. W. (2011). EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* **31**(2): 669-677.
- Agrawal S. M., Silva C., Wang J., Tong J. P. and Yong V. W. (2012). A novel anti-EMMPRIN function-blocking antibody reduces T cell proliferation and neurotoxicity: relevance to multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* **9**: 64.
- Ahmado A., Carr A. J., Vugler A. A., Semo M., Gias C., Lawrence J. M., Chen L. L., Chen F. K., Turowski P., da Cruz L. and Coffey P. J. (2011). Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(10): 7148-7159.
- Aisenbrey S., Zhang M., Bacher D., Yee J., Brunken W. J. and Hunter D. D. (2006). Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(12): 5537-5544.
- Ajmal M., Khan M. I., Neveling K., Khan Y. M., Ali S. H., Ahmed W., Iqbal M. S., Azam M., den Hollander A. I., Collin R. W., Qamar R. and Cremers F. P. (2012). Novel mutations in RDH5 cause fundus albipunctatus in two consanguineous Pakistani families. *Mol Vis* **18**: 1558-1571.
- Akrami H., Soheili Z. S., Sadeghizadeh M., Khalooghi K., Ahmadi H., Kanavi M. R., Samiei S. and Pakravesh J. (2011). Evaluation of RPE65, CRALBP, VEGF, CD68, and tyrosinase gene expression in human retinal pigment epithelial cells cultured on amniotic membrane. *Biochem Genet* **49**(5-6): 313-322.
- Al-Hussaini H., Kam J. H., Vugler A., Semo M. and Jeffery G. (2008). Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo. *Mol Vis* **14**: 1784-1791.
- Alexander C. S. and Keller H. (1990). [Etiology and occurrence of periodic eye inflammation of horses in the area of Berlin]. *Tierarztl Prax* **18**(6): 623-627.
- Alge-Priglinger C. S., Andre S., Schoeffl H., Kampik A., Strauss R. W., Kernt M., Gabius H. J. and Priglinger S. G. (2011). Negative regulation of RPE cell attachment by carbohydrate-dependent cell surface binding of galectin-3 and inhibition of the ERK-MAPK pathway. *Biochimie* **93**(3): 477-488.
- Alge C. S., Hauck S. M., Priglinger S. G., Kampik A. and Ueffing M. (2006). Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res* **5**(4): 862-878.
- Alge C. S., Suppmann S., Priglinger S. G., Neubauer A. S., May C. A., Hauck S., Welge-Lussen U., Ueffing M. and Kampik A. (2003). Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(8): 3629-3641.
- Apweiler R., Aslanidis C., Deufel T., Gerstner A., Hansen J., Hochstrasser D., Kellner R., Kubicek M., Lottspeich F., Maser E., Mewes H. W., Meyer H. E., Mullner S., Mutter W., Neumaier M., Nollau P., Nothwang H. G., Ponten F., Radbruch A., Reinert K.,

- Rothe G., Stockinger H., Tarnok A., Taussig M. J., Thiel A., Thiery J., Ueffing M., Valet G., Vandekerckhove J., Wagener C., Wagner O. and Schmitz G. (2009). Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry A* **75**(10): 816-832.
- Argraves W. S., Tran H., Burgess W. H. and Dickerson K. (1990). Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J Cell Biol* **111**(6 Pt 2): 3155-3164.
- Aronson S. B. (1965). The homoimmune uveitises in the guinea pig. *Ann N Y Acad Sci* **124**(1): 365-376.
- Aruta C., Giordano F., De Marzo A., Comitato A., Raposo G., Nandrot E. F. and Marigo V. (2011). In vitro differentiation of retinal pigment epithelium from adult retinal stem cells. *Pigment Cell Melanoma Res* **24**(1): 233-240.
- Bae-Harboe Y. S. and Park H. Y. (2012). Tyrosinase: a central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *J Invest Dermatol* **132**(12): 2678-2680.
- Baetz N. W., Stamer W. D. and Yool A. J. (2012). Stimulation of aquaporin-mediated fluid transport by cyclic GMP in human retinal pigment epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**(4): 2127-2132.
- Ban Y. and Rizzolo L. J. (2000). Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res* **121**(1): 89-95.
- Bandello F., Lattanzio R., Zucchiatti I. and Del Turco C. (2013). Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. *Acta Diabetol*.
- Barbosa E. B., Vidotto A., Polachini G. M., Henrique T., Marqui A. B. and Tajara E. H. (2012). Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Rev Assoc Med Bras* **58**(3): 366-375.
- Barisani-Asenbauer T., Maca S. M., Mejdoubi L., Emminger W., Machold K. and Auer H. (2012). Uveitis- a rare disease often associated with systemic diseases and infections- a systematic review of 2619 patients. *Orphanet J Rare Dis* **7**: 57.
- Barrera N. P. and Robinson C. V. (2011). Advances in the mass spectrometry of membrane proteins: from individual proteins to intact complexes. *Annu Rev Biochem* **80**: 247-271.
- Benhar I., London A. and Schwartz M. (2012). The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. *Front Immunol* **3**: 296.
- Berditchevski F., Chang S., Bodorova J. and Hemler M. E. (1997). Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem* **272**(46): 29174-29180.
- Bhutto I. A., McLeod D. S., Hasegawa T., Kim S. Y., Merges C., Tong P. and Luty G. A. (2006). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* **82**(1): 99-110.
- Biesemeier A., Kreppel F., Kochanek S. and Schraermeyer U. (2010). The classical pathway of melanogenesis is not essential for melanin synthesis in the adult retinal pigment epithelium. *Cell Tissue Res* **339**(3): 551-560.
- Brizzi M. F., Tarone G. and Defilippi P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol* **24**(5): 645-651.
- Brunner D., Frank J., Appl H., Schoffl H., Pfaller W. and Gstraunthaler G. (2010). Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* **27**(1): 53-62.
- Burke J. M. (2008). Epithelial phenotype and the RPE: is the answer blowing in the Wnt? *Prog Retin Eye Res* **27**(6): 579-595.
- Campochario P. A. and Hackett S. F. (1993). Corneal endothelial cell matrix promotes expression of differentiated features of retinal pigmented epithelial cells: implication

- of laminin and basic fibroblast growth factor as active components. *Exp Eye Res* **57**(5): 539-547.
- Campochiaro P. A., Jerdon J. A. and Glaser B. M. (1986). The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**(11): 1615-1621.
- Caspi R. R. (1999). Immune mechanisms in uveitis. *Springer Semin Immunopathol* **21**(2): 113-124.
- Caspi R. R. (2010). A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* **120**(9): 3073-3083.
- Caspi R. R., Roberge F. G., Chan C. C., Wiggert B., Chader G. J., Rozenszajn L. A., Lando Z. and Nussenblatt R. B. (1988). A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* **140**(5): 1490-1495.
- Chen C. L., Liang C. M., Chen Y. H., Tai M. C., Lu D. W. and Chen J. T. (2012). Glucosamine modulates TNF-alpha-induced ICAM-1 expression and function through O-linked and N-linked glycosylation in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**(4): 2281-2291.
- Chen M., Muckersie E., Robertson M., Fraczek M., Forrester J. V. and Xu H. (2008). Characterization of a spontaneous mouse retinal pigment epithelial cell line B6-RPE07. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(8): 3699-3706.
- Chen P. M., Gombart Z. J. and Chen J. W. (2011). Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads to lysosome dilation and intracellular lipid accumulation: possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration. *Cell Biosci* **1**(1): 10.
- Chen Y., Bedell M. and Zhang K. (2010). Age-related macular degeneration: genetic and environmental factors of disease. *Mol Interv* **10**(5): 271-281.
- Choi G., Landin J., Galan J. F., Birge R. R., Albert A. D. and Yeagle P. L. (2002). Structural studies of metarhodopsin II, the activated form of the G-protein coupled receptor, rhodopsin. *Biochemistry* **41**(23): 7318-7324.
- Ciatto C., Bahna F., Zampieri N., VanSteenhouse H. C., Katsamba P. S., Ahlsen G., Harrison O. J., Brasch J., Jin X., Posy S., Vendome J., Ranscht B., Jessell T. M., Honig B. and Shapiro L. (2010). T-cadherin structures reveal a novel adhesive binding mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **17**(3): 339-347.
- Citirik M., Kabatas E. U., Batman C., Akin K. O. and Kabatas N. (2012). Vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in proliferative diabetic retinopathy versus proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* **47**(1): 7-12.
- Crane I. J. and Liversidge J. (2008). Mechanisms of leukocyte migration across the blood-retina barrier. *Semin Immunopathol* **30**(2): 165-177.
- Cunha-Vaz J. G. (1976). The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol* **41**(2): 287-327.
- Daniele L. L., Sauer B., Gallagher S. M., Pugh E. N., Jr. and Philp N. J. (2008). Altered visual function in monocarboxylate transporter 3 (Slc16a8) knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(2): C451-457.
- Davis A. A., Bernstein P. S., Bok D., Turner J., Nachtigal M. and Hunt R. C. (1995). A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(5): 955-964.
- De Kozak Y., Fre, Usui M. and Faure J. P. (1976). [Experimental autoimmune uveoretinitis. Ultrastructure of chorioretinal lesions induced in guinea pigs by immunization against the outer rods of the bovine retina]. *Arch Ophthalmol (Paris)* **36**(3): 231-248.
- Deeg C. A. (2009). A proteomic approach for studying the pathogenesis of spontaneous equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Immunol Immunopathol* **128**(1-3): 132-136.
- Deeg C. A., Altmann F., Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M. and Ueffing M. (2007a). Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic

- lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* **7**(9): 1540-1548.
- Deeg C. A., Amann B., Raith A. J. and Kaspers B. (2006a). Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(2): 652-656.
- Deeg C. A., Ehrenhofer M., Thurau S. R., Reese S., Wildner G. and Kaspers B. (2002a). Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* **75**(2): 127-133.
- Deeg C. A., Hauck S. M., Amann B., Pompetzki D., Altmann F., Raith A., Schmalzl T., Stangassinger M. and Ueffing M. (2008). Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* **40**(3-4): 151-153.
- Deeg C. A., Kaspers B., Gerhards H., Thurau S. R., Wollanke B. and Wildner G. (2001). Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(2): 393-398.
- Deeg C. A., Pompetzki D., Raith A. J., Hauck S. M., Amann B., Suppmann S., Goebel T. W., Olazabal U., Gerhards H., Reese S., Stangassinger M., Kaspers B. and Ueffing M. (2006b). Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* **5**(8): 1462-1470.
- Deeg C. A., Raith A. J., Amann B., Crabb J. W., Thurau S. R., Hauck S. M., Ueffing M., Wildner G. and Stangassinger M. (2007b). CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* **2007**: 39245.
- Deeg C. A., Reese S., Gerhards H., Wildner G. and Kaspers B. (2004). The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(7): 2286-2292.
- Deeg C. A., Thurau S. R., Gerhards H., Ehrenhofer M., Wildner G. and Kaspers B. (2002b). Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* **32**(9): 2598-2606.
- Degroote R. L., Hauck S. M., Kremmer E., Amann B., Ueffing M. and Deeg C. A. (2012). Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics* **75**(14): 4536-4544.
- Deguchi J., Yamamoto A., Yoshimori T., Sugasawa K., Moriyama Y., Futai M., Suzuki T., Kato K., Uyama M. and Tashiro Y. (1994). Acidification of phagosomes and degradation of rod outer segments in rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(2): 568-579.
- Devine L., Lightman S. L. and Greenwood J. (1996). Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology* **88**(3): 456-462.
- Doherty M. K. and Whitfield P. D. (2011). Proteomics moves from expression to turnover: update and future perspective. *Expert Rev Proteomics* **8**(3): 325-334.
- Dontsov A. E., Glickman R. D. and Ostrovsky M. A. (1999). Retinal pigment epithelium pigment granules stimulate the photo-oxidation of unsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* **26**(11-12): 1436-1446.
- Dunn K. C., Aotaki-Keen A. E., Putkey F. R. and Hjelmeland L. M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* **62**(2): 155-169.
- Eberhardt C., Amann B., Feuchtinger A., Hauck S. M. and Deeg C. A. (2011). Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Muller glial cell-dependent ion and water homeostasis. *Glia* **59**(5): 697-707.
- Ehrenhofer M. C., Deeg C. A., Reese S., Liebich H. G., Stangassinger M. and Kaspers B. (2002). Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol* **5**(1): 39-47.

- Eisenfeld A. J., Bunt-Milam A. H. and Saari J. C. (1987). Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Exp Eye Res* **44**(3): 425-438.
- Elnér S. G. and Elnér V. M. (1996). The integrin superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**(5): 696-701.
- Engelmann K. and Valtink M. (2004). RPE cell cultivation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **242**(1): 65-67.
- Fagerberg L., Jonasson K., von Heijne G., Uhlen M. and Berglund L. (2010). Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics* **10**(6): 1141-1149.
- Fernandez-Bueno I., Rodriguez de la Rua E., Hileeto D., Parrado M. L., Regueiro-Purrinos M., Sala-Puigdollers A., Srivastava G. K., Gonzalo-Orden J. M. and Pastor J. C. (2012). Histology and immunochemistry evaluation of autologous translocation of retinal pigment epithelium-choroid graft in porcine eyes. *Acta Ophthalmol*.
- Finnemann S. C., Leung L. W. and Rodriguez-Boulan E. (2002). The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3842-3847.
- Finnemann S. C. and Nandrot E. F. (2006). MerTK activation during RPE phagocytosis in vivo requires alphaVbeta5 integrin. *Adv Exp Med Biol* **572**: 499-503.
- Ford K. M. and D'Amore P. A. (2012). Molecular regulation of vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **18**: 519-527.
- Forrester J. V. and Xu H. (2012). Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol* **3**: 338.
- Fujinami R. S., von Herrath M. G., Christen U. and Whitton J. L. (2006). Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* **19**(1): 80-94.
- Gabrielsen A., Lawler P. R., Yongzhong W., Steinbruchel D., Blagoja D., Paulsson-Berne G., Kastrup J. and Hansson G. K. (2007). Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **42**(4): 870-883.
- Gallagher-Colombo S., Maminishkis A., Tate S., Grunwald G. B. and Philp N. J. (2010). Modulation of MCT3 expression during wound healing of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(10): 5343-5350.
- Gasparin F., Takahashi B. S., Scolari M. R., Gasparin F., Pedral L. S. and Damico F. M. (2012). Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. *Arq Bras Oftalmol* **75**(2): 143-147.
- Gilger B. C., Malok E., Cutter K. V., Stewart T., Horohov D. W. and Allen J. B. (1999). Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* **71**(1): 17-28.
- Gilger B. C. and Michau T. M. (2004). Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* **20**(2): 417-427, vii.
- Gilger B. C., Salmon J. H., Yi N. Y., Barden C. A., Chandler H. L., Wendt J. A. and Colitz C. M. (2008). Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States. *Am J Vet Res* **69**(10): 1329-1335.
- Gilger B. C., Wilkie D. A., Clode A. B., McMullen R. J., Jr., Utter M. E., Komaromy A. M., Brooks D. E. and Salmon J. H. (2010). Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* **13**(5): 294-300.
- Goodman S. L. and Picard M. (2012). Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* **33**(7): 405-412.

- Gordiyenko N. V., Fariss R. N., Zhi C. and MacDonald I. M. (2010). Silencing of the CHM gene alters phagocytic and secretory pathways in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(2): 1143-1150.
- Grassmann J., Scheerle R. K. and Letzel T. (2012). Functional proteomics: application of mass spectrometry to the study of enzymology in complex mixtures. *Anal Bioanal Chem* **402**(2): 625-645.
- Greenwood J., Howes R. and Lightman S. (1994). The blood-retinal barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. Leukocyte interactions and functional damage. *Lab Invest* **70**(1): 39-52.
- Greer S., Honeywell R., Geletu M., Arulanandam R. and Raptis L. (2010). Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *J Immunol Methods* **355**(1-2): 76-79.
- Grisanti S., Heimann K. and Wiedemann P. (1994). Immune response to specific molecules of the retina in proliferative vitreoretinal disorders. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **232**(5): 302-307.
- Gu Y. C., Nilsson K., Eng H. and Ekblom M. (2000). Association of extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 with fibronectin in bone marrow stroma. *Br J Haematol* **109**(2): 305-313.
- Guerin-Dubiard C., Pasco M., Molle D., Desert C., Croguennec T. and Nau F. (2006). Proteomic analysis of hen egg white. *J Agric Food Chem* **54**(11): 3901-3910.
- Gullapalli V. K., Sugino I. K. and Zarbin M. A. (2008). Culture-induced increase in alpha integrin subunit expression in retinal pigment epithelium is important for improved resurfacing of aged human Bruch's membrane. *Exp Eye Res* **86**(2): 189-200.
- Gundersen D., Orłowski J. and Rodriguez-Boulan E. (1991). Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol* **112**(5): 863-872.
- Gundersen D., Powell S. K. and Rodriguez-Boulan E. (1993). Apical polarization of N-CAM in retinal pigment epithelium is dependent on contact with the neural retina. *J Cell Biol* **121**(2): 335-343.
- Hahne M., Zorn-Kruppa M., Guzman G., Brandner J. M., Haltner-Ukomado E., Watzig H. and Reichl S. (2012). Prevalidation of a human cornea construct as an alternative to animal corneas for in vitro drug absorption studies. *J Pharm Sci* **101**(8): 2976-2988.
- Halbleib J. M. and Nelson W. J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* **20**(23): 3199-3214.
- Ham D. I., Gentleman S., Chan C. C., McDowell J. H., Redmond T. M. and Gery I. (2002). RPE65 is highly uveitogenic in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(7): 2258-2263.
- Hamel C. P., Tsilou E., Harris E., Pfeffer B. A., Hooks J. J., Detrick B. and Redmond T. M. (1993). A developmentally regulated microsomal protein specific for the pigment epithelium of the vertebrate retina. *J Neurosci Res* **34**(4): 414-425.
- Hauck S. M., Dietter J., Kramer R. L., Hofmaier F., Zipplies J. K., Amann B., Feuchtinger A., Deeg C. A. and Ueffing M. (2010). Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **9**(10): 2292-2305.
- Hauck S. M., Hofmaier F., Dietter J., Swadzba M. E., Blindert M., Amann B., Behler J., Kremmer E., Ueffing M. and Deeg C. A. (2012). Label-free LC-MS/MS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics* **75**(14): 4545-4554.
- Hay R. J., Reid Y. A., McClintock P. R., Chen T. R. and Macy M. L. (1996). Cell line banks and their role in cancer research. *J Cell Biochem Suppl* **24**: 107-130.

- Hennig M., Bauer D., Wasmuth S., Busch M., Walscheid K., Thanos S. and Heiligenhaus A. (2012). Everolimus improves experimental autoimmune uveoretinitis. *Exp Eye Res* **105**: 43-52.
- Henry M. D. and Campbell K. P. (1996). Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 625-631.
- Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I. and Kurachi Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* **90**(1): 291-366.
- Hofmaier F., Hauck S. M., Amann B., Degroote R. L. and Deeg C. A. (2011). Changes in matrix metalloproteinase network in a spontaneous autoimmune uveitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(5): 2314-2320.
- Huang J., Possin D. E. and Saari J. C. (2009). Localizations of visual cycle components in retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **15**: 223-234.
- Hunter J. J., Morgan J. I., Merigan W. H., Sliney D. H., Sparrow J. R. and Williams D. R. (2012). The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Prog Retin Eye Res* **31**(1): 28-42.
- Huynh K. K., Eskelinen E. L., Scott C. C., Malevanets A., Saftig P. and Grinstein S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* **26**(2): 313-324.
- Immel J. and Steinberg R. H. (1986). Spatial buffering of K⁺ by the retinal pigment epithelium in frog. *J Neurosci* **6**(11): 3197-3204.
- Irschick E. U., Haas G., Geiger M., Singer W., Ritsch-Marte M., Konwalinka G., Frick M., Gottinger W. and Huemer H. P. (2006). Phagocytosis of human retinal pigment epithelial cells: evidence of a diurnal rhythm, involvement of the cytoskeleton and interference of antiviral drugs. *Ophthalmic Res* **38**(3): 164-174.
- Irschick E. U., Sgonc R., Bock G., Wolf H., Fuchs D., Nussbaumer W., Gottinger W. and Huemer H. P. (2004). Retinal pigment epithelial phagocytosis and metabolism differ from those of macrophages. *Ophthalmic Res* **36**(4): 200-210.
- Jaffe G. J. (1994). Thrombospondin as a component of the extracellular matrix of epiretinal membranes: comparisons with cellular fibronectin. *Surv Ophthalmol* **38**(4): 393-394.
- Jafurulla M. and Chattopadhyay A. (2013). Membrane lipids in the function of serotonin and adrenergic receptors. *Curr Med Chem* **20**(1): 47-55.
- Jarrett S. G. and Boulton M. E. (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* **33**(4): 399-417.
- Jin M., Li S., Moghrabi W. N., Sun H. and Travis G. H. (2005). Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* **122**(3): 449-459.
- Joseph D. P. and Miller S. S. (1991). Apical and basal membrane ion transport mechanisms in bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol* **435**: 439-463.
- Kannan R., Sreekumar P. G. and Hinton D. R. (2011). VEGF and PEDF secretion in ARPE-19 and fhRPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(12): 9047.
- Karavitis J. and Kovacs E. J. (2011). Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *J Leukoc Biol* **90**(6): 1065-1078.
- Karl M. O., Valtink M., Bednarz J. and Engelmann K. (2007). Cell culture conditions affect RPE phagocytic function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **245**(7): 981-991.
- Katagiri N., Terakita A., Shichida Y. and Katagiri Y. (2001). Demonstration of a rhodopsin-retinochrome system in the stalk eye of a marine gastropod, *Onchidium*, by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* **433**(3): 380-389.
- Kato K., Ishiguro S., Yamamoto H., Yanai N., Obinata M. and Tamai M. (1996). A retinal pigment epithelium-derived cell line from transgenic mouse harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Cell Struct Funct* **21**(6): 459-468.

- Kaur C., Foulds W. S. and Ling E. A. (2008). Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res* **27**(6): 622-647.
- Kawaguchi T., Yamagishi S. I. and Sata M. (2010). Structure-function relationships of PEDF. *Curr Mol Med* **10**(3): 302-311.
- Kevany B. M. and Palczewski K. (2010). Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)* **25**(1): 8-15.
- Kigasawa K., Soushi S., Tanaka Y. and Obazawa H. (1994). Morphologic and chromosomal study of a human retinal pigment epithelial cell line. *Jpn J Ophthalmol* **38**(1): 10-15.
- Kinnunen K., Petrovski G., Moe M. C., Berta A. and Kaarniranta K. (2012). Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* **90**(4): 299-309.
- Kirk P., Wilson M. C., Heddle C., Brown M. H., Barclay A. N. and Halestrap A. P. (2000). CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* **19**(15): 3896-3904.
- Kiser P. D., Golczak M., Maeda A. and Palczewski K. (2012). Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochim Biophys Acta* **1821**(1): 137-151.
- Kivela T. and Uusitalo M. (1998). Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye. *Prog Retin Eye Res* **17**(3): 385-428.
- Klass C. M., Couchman J. R. and Woods A. (2000). Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci* **113** (Pt 3): 493-506.
- Kokkinopoulos I., Shahabi G., Colman A. and Jeffery G. (2011). Mature peripheral RPE cells have an intrinsic capacity to proliferate; a potential regulatory mechanism for age-related cell loss. *PLoS One* **6**(4): e18921.
- Korenbrod J. I. (2012). Speed, sensitivity, and stability of the light response in rod and cone photoreceptors: facts and models. *Prog Retin Eye Res* **31**(5): 442-466.
- Kotb A. M., Hierholzer A. and Kemler R. (2011). Replacement of E-cadherin by N-cadherin in the mammary gland leads to fibrocystic changes and tumor formation. *Breast Cancer Res* **13**(5): R104.
- Kusaka S., Inanobe A., Fujita A., Makino Y., Tanemoto M., Matsushita K., Tano Y. and Kurachi Y. (2001). Functional Kir7.1 channels localized at the root of apical processes in rat retinal pigment epithelium. *J Physiol* **531**(Pt 1): 27-36.
- Langley S. R., Dwyer J., Drozdov I., Yin X. and Mayr M. (2013). Proteomics: from single molecules to biological pathways. *Cardiovasc Res*.
- Lanier L. L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J. J., Hemperly J. J. and Phillips J. H. (1991). Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* **146**(12): 4421-4426.
- Lee R. W. and Dick A. D. (2012). Current concepts and future directions in the pathogenesis and treatment of non-infectious intraocular inflammation. *Eye (Lond)* **26**(1): 17-28.
- Liggett T. E., Griffiths T. D. and Gaillard E. R. (2009). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized bovine retinal pigmented epithelial cell line. *BMC Cell Biol* **10**: 33.
- Limb G. A., Salt T. E., Munro P. M., Moss S. E. and Khaw P. T. (2002). In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(3): 864-869.
- Linsenmeier R. A. and Padnick-Silver L. (2000). Metabolic dependence of photoreceptors on the choroid in the normal and detached retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(10): 3117-3123.
- Lowell C. A. and Mayadas T. N. (2012). Overview: studying integrins in vivo. *Methods Mol Biol* **757**: 369-397.

- Luna J. D., Chan C. C., Derevjaniuk N. L., Mahlow J., Chiu C., Peng B., Tobe T., Campochiaro P. A. and Viores S. A. (1997). Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res* **49**(3): 268-280.
- Luo Y., Zhuo Y., Fukuhara M. and Rizzolo L. J. (2006). Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(8): 3644-3655.
- Majumdar S., Gunda S., Pal D. and Mitra A. K. (2005). Functional activity of a monocarboxylate transporter, MCT1, in the human retinal pigmented epithelium cell line, ARPE-19. *Mol Pharm* **2**(2): 109-117.
- Mann K. (2007). The chicken egg white proteome. *Proteomics* **7**(19): 3558-3568.
- Mann K. and Mann M. (2011). In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos. *Proteome Sci* **9**(1): 7.
- Marmor M. F. (1990). Control of subretinal fluid: experimental and clinical studies. *Eye (Lond)* **4** (Pt 2): 340-344.
- Marmorstein A. D., Finnemann S. C., Bonilha V. L. and Rodriguez-Boulan E. (1998a). Morphogenesis of the retinal pigment epithelium: toward understanding retinal degenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci* **857**: 1-12.
- Marmorstein A. D., Gan Y. C., Bonilha V. L., Finnemann S. C., Csaky K. G. and Rodriguez-Boulan E. (1998b). Apical polarity of N-CAM and EMMPRIN in retinal pigment epithelium resulting from suppression of basolateral signal recognition. *J Cell Biol* **142**(3): 697-710.
- Masland R. H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron* **76**(2): 266-280.
- McLaren M. J., Sasabe T., Li C. Y., Brown M. E. and Inana G. (1993). Spontaneously arising immortal cell line of rat retinal pigmented epithelial cells. *Exp Cell Res* **204**(2): 311-320.
- Medawar P. B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* **29**(1): 58-69.
- Mete G., Turgut Y., Osman A., Gulsen U. and Hakan A. (2011). Anterior segment intraocular metallic foreign body causing chronic hypopyon uveitis. *J Ophthalmic Inflamm Infect* **1**(2): 85-87.
- Miller R. F. (2008). Cell communication mechanisms in the vertebrate retina the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(12): 5184-5198.
- Milner R. and Campbell I. L. (2002). The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res* **69**(3): 286-291.
- Minakami R., Maehara Y., Kamakura S., Kumano O., Miyano K. and Sumimoto H. (2010). Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils. *Genes Cells* **15**(5): 409-424.
- Mochizuki M., Sugita S. and Kamoi K. (2012). Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res*.
- Moiseyev G., Takahashi Y., Chen Y., Kim S. and Ma J. X. (2008). RPE65 from cone-dominant chicken is a more efficient isomerohydrolase compared with that from rod-dominant species. *J Biol Chem* **283**(13): 8110-8117.
- Monteoliva L. and Albar J. P. (2004). Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**(3): 220-239.
- Morley M., Jones C., Sidhu M., Gupta V., Bernier S. M., Rushlow W. J. and Belliveau D. J. (2010). PKC inhibition increases gap junction intercellular communication and cell adhesion in human neuroblastoma. *Cell Tissue Res* **340**(2): 229-242.

- Morohoshi K., Goodwin A. M., Ohbayashi M. and Ono S. J. (2009). Autoimmunity in retinal degeneration: autoimmune retinopathy and age-related macular degeneration. *J Autoimmun* **33**(3-4): 247-254.
- Motulsky E., Koch P., Janssens S., Lienart M., Vanbellinghen A. M., Bolaky N., Chan C. C., Caspers L., Martin-Martinez M. D., Xu H., Delporte C. and Willermain F. (2010). Aquaporin expression in blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis. *Mol Vis* **16**: 602-610.
- Nabi I. R., Mathews A. P., Cohen-Gould L., Gundersen D. and Rodriguez-Boulan E. (1993). immortalization of polarized rat retinal pigment epithelium. *J Cell Sci* **104** (Pt 1): 37-49.
- Nagai H. and Kalnins V. I. (1996). Normally occurring loss of single cells and repair of resulting defects in retinal pigment epithelium in situ. *Exp Eye Res* **62**(1): 55-61.
- Nagineeni C. N., Kommineni V. K., William A., Detrick B. and Hooks J. J. (2012). Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. *J Cell Physiol* **227**(1): 116-126.
- Nakayasu M., Saeki H., Tohda H. and Oikawa A. (1977). Effects of sugars on melanogenesis in cultured melanoma cells. *J Cell Physiol* **92**(1): 49-55.
- Nandrot E. F., Silva K. E., Scelfo C. and Finnemann S. C. (2012). Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of alphavbeta5 integrin. *Biol Cell* **104**(6): 326-341.
- Nicholson D., Kerr E. C., Jepps O. G. and Nicholson L. B. (2012). Modelling experimental uveitis: barrier effects in autoimmune disease. *Inflamm Res* **61**(7): 759-773.
- Niederhorn J. Y. (2012). Ocular immune privilege and ocular melanoma: parallel universes or immunological plagiarism? *Front Immunol* **3**: 148.
- Niederhorn J. Y. and Stein-Streilein J. (2010). History and physiology of immune privilege. *Ocul Immunol Inflamm* **18**(1): 19-23.
- Nishibaba R., Higashi Y., Su J., Furukawa T., Kawai K. and Kanekura T. (2012). CD147-targeting siRNA inhibits cell-matrix adhesion of human malignant melanoma cells by phosphorylating focal adhesion kinase. *J Dermatol* **39**(1): 63-67.
- Noma H., Funatsu H., Mimura T., Eguchi S., Shimada K. and Hori S. (2011). Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in macular edema with central retinal vein occlusion. *Curr Eye Res* **36**(3): 256-263.
- Nordgaard C. L., Karunadharm P. P., Feng X., Olsen T. W. and Ferrington D. A. (2008). Mitochondrial proteomics of the retinal pigment epithelium at progressive stages of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(7): 2848-2855.
- Nussenblatt R. B. (1990). The natural history of uveitis. *Int Ophthalmol* **14**(5-6): 303-308.
- Paglia D. T., Miller P. E. and Dubielzig R. R. (2004). James Wardrop and equine recurrent uveitis. *Arch Ophthalmol* **122**(8): 1218-1223.
- Pan X., Li J., Du W., Yu X., Zhu C., Yu C., Cao H., Zhang Y., Chen Y. and Li L. (2012). Establishment and characterization of immortalized human hepatocyte cell line for applications in bioartificial livers. *Biotechnol Lett* **34**(12): 2183-2190.
- Parker R. O. and Crouch R. K. (2010). Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp Eye Res* **91**(6): 788-792.
- Pattnaik B. R. and Hughes B. A. (2009). Regulation of Kir channels in bovine retinal pigment epithelial cells by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(4): C1001-1011.
- Penha A. M., Schaeffel F. and Feldkaemper M. (2011). Insulin, insulin-like growth factor-1, insulin receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor expression in the chick eye and their regulation with imposed myopic or hyperopic defocus. *Mol Vis* **17**: 1436-1448.

- Philp N. J., Ochrietor J. D., Rudoy C., Muramatsu T. and Linser P. J. (2003a). Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(3): 1305-1311.
- Philp N. J., Wang D., Yoon H. and Hjelmeland L. M. (2003b). Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(4): 1716-1721.
- Presburg M., Kumps C. and De Vos L. (2002). Submicroscopic anatomy of photoreceptors in the female scale insect *Eupulvinaria hydrangeae* (Homopteres, Coccidae). *J Submicrosc Cytol Pathol* **34**(1): 9-16.
- Proulx S., Guerin S. L. and Salesse C. (2003). Effect of quiescence on integrin alpha5beta1 expression in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **9**: 473-481.
- Proulx S., Landreville S., Guerin S. L. and Salesse C. (2004). Integrin alpha5 expression by the ARPE-19 cell line: comparison with primary RPE cultures and effect of growth medium on the alpha5 gene promoter strength. *Exp Eye Res* **79**(2): 157-165.
- Rajasekaran S. A., Hu J., Gopal J., Gallemore R., Ryazantsev S., Bok D. and Rajasekaran A. K. (2003). Na,K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(6): C1497-1507.
- Rambhatla L., Chiu C. P., Glickman R. D. and Rowe-Rendleman C. (2002). In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(5): 1622-1630.
- Reinisalo M., Putula J., Mannermaa E., Urtti A. and Honkakoski P. (2012). Regulation of the human tyrosinase gene in retinal pigment epithelium cells: the significance of transcription factor orthodenticle homeobox 2 and its polymorphic binding site. *Mol Vis* **18**: 38-54.
- Rizzolo L. J., Chen X., Weitzman M., Sun R. and Zhang H. (2007). Analysis of the RPE transcriptome reveals dynamic changes during the development of the outer blood-retinal barrier. *Mol Vis* **13**: 1259-1273.
- Rizzolo L. J., Peng S., Luo Y. and Xiao W. (2011). Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* **30**(5): 296-323.
- Rodriguez-Suarez E. and Whetton A. D. (2013). The application of quantification techniques in proteomics for biomedical research. *Mass Spectrom Rev* **32**(1): 1-26.
- Roebuck K. A. and Finnegan A. (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* **66**(6): 876-888.
- Rosenthal R., Heimann H., Agostini H., Martin G., Hansen L. L. and Strauss O. (2007). Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Mol Vis* **13**: 443-456.
- Rotilio D., Della Corte A., D'Imperio M., Coletta W., Marccone S., Silvestri C., Giordano L., Di Michele M. and Donati M. B. (2012). Proteomics: bases for protein complexity understanding. *Thromb Res* **129**(3): 257-262.
- Ruggieri S., Frassanito M. A., Dammacco R. and Guerriero S. (2012). Treg lymphocytes in autoimmune uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* **20**(4): 255-261.
- Ruta L. M., Magliano D. J., Lemesurier R., Taylor H. R., Zimmet P. Z. and Shaw J. E. (2013). Prevalence of diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in developing and developed countries. *Diabet Med*.
- Saari J. C. (2012). Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles. *Annu Rev Nutr* **32**: 125-145.
- Sadaka A. and Giuliani G. P. (2012). Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments. *Clin Ophthalmol* **6**: 1325-1333.

- Sanui H., Redmond T. M., Kotake S., Wiggert B., Tanaka T., Chader G. J. and Gery I. (1990). Uveitis and immune responses in primates immunized with IRBP-derived synthetic peptides. *Curr Eye Res* **9**(2): 193-199.
- Sarna T., Burke J. M., Korytowski W., Rozanowska M., Skumatz C. M., Zareba A. and Zareba M. (2003). Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exp Eye Res* **76**(1): 89-98.
- Sato R., Yasukawa T., Kacza J., Eichler W., Nishiwaki A., Iandiev I., Ohbayashi M., Kato A., Yafai Y., Bringmann A., Takase A., Ogura Y., Seeger J. and Wiedemann P. (2012). Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch's membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Schadel S. A., Heck M., Maretzki D., Filipek S., Teller D. C., Palczewski K. and Hofmann K. P. (2003). Ligand channeling within a G-protein-coupled receptor. The entry and exit of retinals in native opsin. *J Biol Chem* **278**(27): 24896-24903.
- Schaeffer W. I. (1990). Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics. Tissue Culture Association Terminology Committee. *In Vitro Cell Dev Biol* **26**(1): 97-101.
- Schonthaler H. B., Lampert J. M., Isken A., Rinner O., Mader A., Gesemann M., Oberhauser V., Golczak M., Biehlmaier O., Palczewski K., Neuhauss S. C. and von Lintig J. (2007). Evidence for RPE65-independent vision in the cone-dominated zebrafish retina. *Eur J Neurosci* **26**(7): 1940-1949.
- Senanayake P., Calabro A., Hu J. G., Bonilha V. L., Darr A., Bok D. and Hollyfield J. G. (2006). Glucose utilization by the retinal pigment epithelium: evidence for rapid uptake and storage in glycogen, followed by glycogen utilization. *Exp Eye Res* **83**(2): 235-246.
- Shibuya M. (2013). Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem* **153**(1): 13-19.
- Shimura M., Kakazu Y., Oshima Y., Tamai M. and Akaike N. (1999). Na⁺,K⁺-ATPase activity in cultured bovine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(1): 96-104.
- Si Y., Wang J., Guan J., Han Q. and Hui Y. (2012). Platelet-Derived Growth Factor Induced Alpha-Smooth Muscle Actin Expression by Human Retinal Pigment Epithelium Cell. *J Ocul Pharmacol Ther*.
- Silva K. C., Rosales M. A., Hamassaki D. E., Saito K. C., Faria A. M., Ribeiro P. A., Lopes de Faria J. B. and Lopes de Faria J. M. (2013). Green tea is neuroprotective in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Simo R., Garcia-Ramirez M., Higuera M. and Hernandez C. (2009). Apolipoprotein A1 is overexpressed in the retina of diabetic patients. *Am J Ophthalmol* **147**(2): 319-325 e311.
- Simo R., Villarroel M., Corraliza L., Hernandez C. and Garcia-Ramirez M. (2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 190724.
- Smith A., Bracke M., Leitinger B., Porter J. C. and Hogg N. (2003). LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3123-3133.
- Smith A., Stanley P., Jones K., Svensson L., McDowall A. and Hogg N. (2007). The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol Rev* **218**: 135-146.

- Soheilian M. M., Ramezani A. M. and Soheilian R. (2013). 25-gauge Vitrectomy for Complicated Chronic Endogenous/Autoimmune Uveitis: Predictors of Outcomes. *Ocul Immunol Inflamm.*
- Sonoda S., Spee C., Barron E., Ryan S. J., Kannan R. and Hinton D. R. (2009). A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc* **4**(5): 662-673.
- Souda P., Ryan C. M., Cramer W. A. and Whitelegge J. (2011). Profiling of integral membrane proteins and their post translational modifications using high-resolution mass spectrometry. *Methods* **55**(4): 330-336.
- Spieß B. M. (1997). [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **139**(3): 126-133.
- Stamer W. D., Bok D., Hu J., Jaffe G. J. and McKay B. S. (2003). Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(6): 2803-2808.
- Steindl-Kuscher K., Krugluger W., Boulton M. E., Haas P., Schratlbauer K., Feichtinger H., Adlassnig W. and Binder S. (2009). Activation of the beta-catenin signaling pathway and its impact on RPE cell cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(9): 4471-4476.
- Stipp C. S. (2010). Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev Mol Med* **12**: e3.
- Strauss O. (1995). *The Retinal Pigment Epithelium. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System.* H. Kolb, E. Fernandez and R. Nelson. Salt Lake City (UT).
- Strauss O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**(3): 845-881.
- Streilein J. W. (1999). Regional immunity and ocular immune privilege. *Chem Immunol* **73**: 11-38.
- Sun M., Finnemann S. C., Febbraio M., Shan L., Annangudi S. P., Podrez E. A., Hoppe G., Darrow R., Organisciak D. T., Salomon R. G., Silverstein R. L. and Hazen S. L. (2006). Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J Biol Chem* **281**(7): 4222-4230.
- Svozilkova P., Heissigerova J., Brichova M., Kalvodova B., Dvorak J. and Rihova E. (2011). The role of pars plana vitrectomy in the diagnosis and treatment of uveitis. *Eur J Ophthalmol* **21**(1): 89-97.
- Swadzba M. E., Hauck S. M., Naim H. Y., Amann B. and Deeg C. A. (2012). Retinal glycoprotein enrichment by concanavalin a enabled identification of novel membrane autoantigen synaptotagmin-1 in equine recurrent uveitis. *PLoS One* **7**(12): e50929.
- Takagi H., Tanihara H., Seino Y. and Yoshimura N. (1994). Characterization of glucose transporter in cultured human retinal pigment epithelial cells: gene expression and effect of growth factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(1): 170-177.
- Takeuchi T., Adachi Y., Ohtsuki Y. and Furihata M. (2007). Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease. *Med Mol Morphol* **40**(3): 115-120.
- Tan S., Tan H. T. and Chung M. C. (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* **8**(19): 3924-3932.
- Tang G., Zhang L., Yang G., Wu L. and Wang R. (2012). Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca(2+) channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia.*
- Taylor A. W. (2009). Ocular immune privilege. *Eye (Lond)* **23**(10): 1885-1889.
- Taylor A. W. and Kaplan H. J. (2010). Ocular immune privilege in the year 2010: ocular immune privilege and uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* **18**(6): 488-492.
- Thorpe T. (2012). History of plant tissue culture. *Methods Mol Biol* **877**: 9-27.

- Tian J., Ishibashi K., Honda S., Boylan S. A., Hjelmeland L. M. and Handa J. T. (2005). The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. *Br J Ophthalmol* **89**(11): 1510-1517.
- Troyanovsky R. B., Chitaev N. A. and Troyanovsky S. M. (1996). Cadherin binding sites of plakoglobin: localization, specificity and role in targeting to adhering junctions. *J Cell Sci* **109** (Pt 13): 3069-3078.
- Tsilou E., Hamel C. P., Yu S. and Redmond T. M. (1997). RPE65, the major retinal pigment epithelium microsomal membrane protein, associates with phospholipid liposomes. *Arch Biochem Biophys* **346**(1): 21-27.
- Uchio E., Kijima M., Tanaka S. and Ohno S. (1994). Suppression of experimental uveitis with monoclonal antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(5): 2626-2631.
- Van Aken E. H., De Wever O., Van Hoorde L., Bruyneel E., De Laey J. J. and Mareel M. M. (2003). Invasion of retinal pigment epithelial cells: N-cadherin, hepatocyte growth factor, and focal adhesion kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(2): 463-472.
- Vega J. L., Saban D., Carrier Y., Masli S. and Weiner H. L. (2010). Retinal pigment epithelial cells induce foxp3(+) regulatory T cells via membrane-bound TGF-beta. *Ocul Immunol Inflamm* **18**(6): 459-469.
- Vermeer P. D., Denker J., Estin M., Moninger T. O., Keshavjee S., Karp P., Kline J. N. and Zabner J. (2009). MMP9 modulates tight junction integrity and cell viability in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**(5): L751-762.
- Vinore S. A., Chan C. C., Vinore M. A., Matteson D. M., Chen Y. S., Klein D. A., Shi A., Ozaki H. and Campochiaro P. A. (1998). Increased vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGFbeta) in experimental autoimmune uveoretinitis: upregulation of VEGF without neovascularization. *J Neuroimmunol* **89**(1-2): 43-50.
- Wacker W. B., Donoso L. A., Kalsow C. M., Yankeelov J. A., Jr. and Organisciak D. T. (1977). Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* **119**(6): 1949-1958.
- Wacker W. B. and Lipton M. M. (1965). Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* **206**(981): 253-254.
- Wallace C. A., Moir G., Malone D., Duncan L., Devarajan G. and Crane I. J. (2013). Regulation of T-lymphocyte CCL3 and CCL4 production by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Weekes M. P., Antrobus R., Lill J. R., Duncan L. M., Hor S. and Lehner P. J. (2010). Comparative analysis of techniques to purify plasma membrane proteins. *J Biomol Tech* **21**(3): 108-115.
- Werry H. and Gerhards H. (1992). [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* **20**(2): 178-186.
- West K. A., Yan L., Miyagi M., Crabb J. S., Marmorstein A. D., Marmorstein L. and Crabb J. W. (2001). Proteome survey of proliferating and differentiating rat RPE-J cells. *Exp Eye Res* **73**(4): 479-491.
- Wewer C., Seibt A., Wolburg H., Greune L., Schmidt M. A., Berger J., Galla H. J., Quitsch U., Schwerk C., Schrotten H. and Tenenbaum T. (2011). Transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with *Streptococcus suis*. *J Neuroinflammation* **8**: 51.
- Whitcup S. M., DeBarge L. R., Caspi R. R., Harning R., Nussenblatt R. B. and Chan C. C. (1993). Monoclonal antibodies against ICAM-1 (CD54) and LFA-1 (CD11a/CD18) inhibit experimental autoimmune uveitis. *Clin Immunol Immunopathol* **67**(2): 143-150.
- Whitelegge J. P. (2013). Integral Membrane Proteins and Bilayer Proteomics. *Anal Chem*.

- Whittaker J. R. (1963). Changes in Melanogenesis during the Dedifferentiation of Chick Retinal Pigment Cells in Cell Culture. *Dev Biol* **8**: 99-127.
- Wight T. N. (2002). Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* **14**(5): 617-623.
- Wildner G., Diedrichs-Mohring M. and Thurau S. R. (2008). Rat models of autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* **40**(3-4): 141-144.
- Wimmers S., Karl M. O. and Strauss O. (2007). Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res* **26**(3): 263-301.
- Wisniewska-Kruk J., Hoeben K. A., Vogels I. M., Gaillard P. J., Van Noorden C. J., Schlingemann R. O. and Klaassen I. (2012). A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res* **96**(1): 181-190.
- Witcher L. L., Collins R., Puttagunta S., Mechanic S. E., Munson M., Gumbiner B. and Cowin P. (1996). Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *J Biol Chem* **271**(18): 10904-10909.
- Wu Z., Bhattacharya S. K., Jin Z., Bonilha V. L., Liu T., Nawrot M., Teller D. C., Saari J. C. and Crabb J. W. (2006). CRALBP ligand and protein interactions. *Adv Exp Med Biol* **572**: 477-483.
- Xu H., Forrester J. V., Liversidge J. and Crane I. J. (2003). Leukocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(1): 226-234.
- Yang D., Swaminathan A., Zhang X. and Hughes B. A. (2008a). Expression of Kir7.1 and a novel Kir7.1 splice variant in native human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* **86**(1): 81-91.
- Yang D., Zhang X. and Hughes B. A. (2008b). Expression of inwardly rectifying potassium channel subunits in native human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* **87**(3): 176-183.
- Yoon H., Fanelli A., Grollman E. F. and Philp N. J. (1997). Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* **234**(1): 90-94.
- Yu D. Y. and Cringle S. J. (2001). Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog Retin Eye Res* **20**(2): 175-208.
- Yuan Q., Kaylor J. J., Miu A., Bassilian S., Whitelegge J. P. and Travis G. H. (2010). Rpe65 isomerase associates with membranes through an electrostatic interaction with acidic phospholipid headgroups. *J Biol Chem* **285**(2): 988-999.
- Yue J., Zhang K. and Chen J. (2012). Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. *Cancer Microenviron* **5**(3): 275-283.
- Zarbin M. A. (2003). Analysis of retinal pigment epithelium integrin expression and adhesion to aged submacular human Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* **101**: 499-520.
- Zhang W., Tan J., Liu Y., Li W., Gao Q. and Lehmann P. V. (2012). Assessment of the innate and adaptive immune system in proliferative vitreoretinopathy. *Eye (Lond)* **26**(6): 872-881.
- Zhang X., Zhang H. F., Puliafito C. A. and Jiao S. (2011). Simultaneous in vivo imaging of melanin and lipofuscin in the retina with photoacoustic ophthalmoscopy and autofluorescence imaging. *J Biomed Opt* **16**(8): 080504.
- Zipplies J. K., Hauck S. M., Eberhardt C., Hirmer S., Amann B., Stangassinger M., Ueffing M. and Deeg C. A. (2012). Miscellaneous vitreous-derived IgM antibodies target numerous retinal proteins in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* **15 Suppl 2**: 57-64.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger für den am Institut für Tierphysiologie der LMU München zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Cornelia Deeg für das vielseitige und sehr interessante Thema, sowie für die großartige fachliche Betreuung bei dieser Arbeit. Trotz eines stets vollen Terminkalenders war sie immer für mich erreichbar, um gemeinsam Zwischenergebnisse und Anregungen für weitere Experimente zu diskutieren und zu erarbeiten.

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Dr. Stefanie Hauck, die während dieser Arbeit ein wichtiger Ansprechpartner für mich war. Vor allem danke ich ihr für die lange, lehrreiche Zeit im Helmholtz Zentrum München, Neuherberg und dafür, dass sie mit ihren kompetenten fachlichen Ratschlägen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herzlichen Dank auch an Frau PD Dr. Claudia Alge-Priglinger, die mir aufgrund ihrer langjährigen Erfahrungen auf dem Gebiet der humanen RPE-Zellen mit Rat und Tat zur Seite stand und mir bei meinen Fragen stets weiterhelfen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Barbara Amann, die mich immer wieder mit Ihren fachlichen Kenntnissen im Labor und am Computer verblüffte. Sie konnte mir in jeder erdenklichen Situation weiterhelfen und dadurch einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leisten. Zudem hellten die lustigen Geschichten einer Zugpendlerin jeden noch so grauen Tag im Labor auf.

Meinen lieben Mädels der AG Deeg bin ich dankbar, dass sie mich während der gesamten Zeit tatkräftig unterstützt haben. Durch die lustige, harmonische und kollegiale Atmosphäre ist die Doktorandenzeit zu einem unvergesslichen Abschnitt meines Lebens geworden. Dabei danke ich ganz herzlich Dr. Margarete Swadzba und Dr. Roxane Degroote für das Korrekturlesen der Arbeit und für alle fachlichen

und künstlerischen Anregungen, die sie zu dieser Arbeit beigetragen haben. Auch möchte ich mich bedanken bei Kerstin Euler, Kristina Fröhlich, Sieglinde Hirmer, Nina Burkhardt und Ute Klein, die mich unterstützt haben, wo sie nur konnten und immer für einen gemeinsamen Lacher zu haben waren.

Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team der Abteilung für Proteinanalytik des Helmholtz Zentrums in München, Neuherberg. Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Marius Ueffing für den dort zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die Möglichkeit zur Nutzung sämtlicher Geräte. Auch bedanke ich mich bei Frau Dr. Juliane Merl, die mir geduldig viele verschiedene Methoden beigebracht hat und bei Fragen immer ein offenes Ohr hatte. Danke auch an Nicole Senninger und Jennifer Behler, die mir tatkräftig im Labor zur Seite standen und auch an Saskia Hanf, die mir bei bürokratischen Belangen ausgeholfen hat.

Bei Familie Veit und der gesamten Belegschaft der Pferdemetzgerei Veit bedanke ich mich für die Pferdeaugen, die sie mir für diese Arbeit überlassen haben.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Olaf Strauss und seine gesamte Arbeitsgruppe in Regensburg für die Einführung in die Präparation von RPE-Zellen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie für die Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit. Vor allem möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben und immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.

Zu guter Letzt will ich mich bei meiner Frau Nicole bedanken, die mich während der gesamten Entstehung dieser Arbeit immer motivierte und, obwohl sie hin und wieder auch tröstende Worte für mich finden musste, nie aufgehört hat fest an mich zu glauben.