

Aus dem  
Department für Veterinärwissenschaften der  
Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Die Bedeutung der Müllerzelle  
für die Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis  
und  
Etablierung einer equinen Müllerzelllinie

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

von  
Christina Eberhardt  
aus  
Isny im Allgäu

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Deeg

Korreferenten: Priv.-Doz. Dr. Reese  
Univ.-Prof. Dr. Köstlin  
Priv.-Doz. Dr. Fischer  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

*Meinen Eltern*

---

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2 LITERATUR.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Equine rezidivierende Uveitis .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Charakterisierung der ERU .....	10
2.1.2 Bedeutung in der Veterinärmedizin .....	10
2.1.3 Ätiologie und Pathogenese der ERU .....	11
2.1.4 Histopathologie der Retina .....	12
<b>2.2 Autoimmune Uveitis des Menschen und Tiermodelle .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Bedeutung der ERU als Modell für autoimmune Uveitis .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Die ERU als spontanes Tiermodell.....	14
2.3.1 Die rezidivierende Uveitis beim Pferd als induzierbares Tiermodell .....	15
<b>2.4 Die Müllerzelle und deren Bedeutung in der Retina.....</b>	<b>16</b>
2.4.1 Morphologische Bedeutung .....	17
2.4.2 Physiologische Bedeutung .....	19
<b>2.5 Müllerzell-Gliose.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Gliose und Uveitis.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Proteomik .....</b>	<b>25</b>
2.7.1 Massenspektrometrie .....	26
2.7.2 LC-MS/MS und LTQ Orbitrap .....	27
2.7.3 Quantitativ vergleichende Proteomanalyse .....	28
<b>2.8 Bedeutung von Membranproteinen.....</b>	<b>29</b>
<b>2.9 Primärkultur und Zelllinien.....</b>	<b>29</b>
<b>3 PUBLIKATION I.....</b>	<b>31</b>
<b>4 PUBLIKATION II.....</b>	<b>43</b>
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>72</b>
<b>7 SUMMARY .....</b>	<b>74</b>

<b>8 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>76</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
°C	Grad Celsius
μm	Mikrometer
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
α-SM	Engl.: alpha-smooth muscle actin
AQP	Aquaporin
ARVO	Engl.: Association for Research in Vision and Ophthalmology
BDNF	Engl.: Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Engl.: Basic fibroblast growth factor
BSA	Engl.: Bovine serum albumin
CD	Engl.: Cluster of differentiation
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CNTF	Engl.: Ciliary neurotrophic factor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRALBP	Engl.: Cellular retinaldehyde-binding protein Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DIC	Engl.: Differential interference contrast
DMEM	Engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Engl.	Englisch
EqMC-7	Engl.: Equine Müller cell line-7
ERU	Engl.: Equine recurrent uveitis Equine rezidivierende Uveitis
EZR	Extrazellulärraum
FBS	Engl.: Fetal bovine serum

## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Gramm
Fig.	Engl.: Figure
GFAP	Engl. : Glial fibrillary acidic protein
GCL	Engl.: Ganglion cell layer Ganglienzellschicht
GLAST	Glutamat/Aspartat Transporter
GS	Engl.: Glutamine synthetase
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H&E	Engl.: Hematoxylin and eosin
HPLC	Engl.: High-performance liquid chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Engl.: Horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin der Klasse G
ILM	Engl.: Inner limiting membrane Innere limitierende Membran
INF $\gamma$	Interferon-gamma
INL	Engl.: Inner nuclear layer Innere Körnerschicht
IPL	Engl.: Inner plexiforme layer Innere plexiforme Schicht
IRBP	Engl.: Interphotoreceptor retinoid-binding protein
K <sup>+</sup>	Kalium
[K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub>	Kaliumkonzentration
Kir	Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal Engl.: inwardly rectifying potassium channel
LC	Engl.: Liquid chromatography Flüssigkeitschromatographie
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LTD	Engl.: Linear trap quadrupole
M	Molar
MALDI	Engl.: Matrix-assisted laser desorption/ionization Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation

## Abkürzungsverzeichnis

---

MHC	Engl.: Major histocompatibility complex Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
min	Minute(n)
mM	Millimolar
mRNA	Engl.: messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
mV	Millivolt
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Engl.: nerve growth factor
No.	Engl.: Number
OLM	Engl.: Outer limiting membrane Äußere limitierende Membran
ONL	Engl.: Outer nuclear layer Äußere Körnerschicht
OPL	Engl.: Outer plexiforme layer Äußere plexiforme Schicht
p	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Engl.: Phosphate buffered saline Phosphatgepufferte Salzlösung
PEDF	Engl.: Pigment epithelium-derived factor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RMP	Engl.: Resting membrane potential Ruhemembranpotenzial
RNA	Engl.: Ribonucleic acid Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
S-Ag	S (Engl.: soluble)-Antigen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFB	Sonderforschungsbereich
siRNA	Engl.: Short-interfering RNA

## Abkürzungsverzeichnis

---

Tab.	Tabelle
TBS	Engl.: Tris buffered saline
TNF $\alpha$	Engl.: Tumor necrosis factor-alpha
TOF	Engl.: Time-of-flight
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine spontan auftretende, autoimmun-medierte Erkrankung des Auges und stellt mit einer Prävalenz von 10% die häufigste Ursache für einen Verlust der Sehfähigkeit bei Pferden dar (Deeg 2008; Gilger and Michau 2004; Spiess 2010). Als einziges spontanes Tiermodell für autoimmune Uveitis hat sie, neben der veterinärmedizinischen Bedeutsamkeit, auch eine besondere Relevanz für die autoimmune Uveitis des Menschen (Deeg et al. 2007c). Charakteristisch für die ERU sind wiederkehrende Entzündungsschübe, die zu einer fortwährenden Schädigung der Architektur der Retina, sowie ihrer physiologischen Funktion führen (Deeg et al. 2002a). Ablaufende Pathogenese-assoziierte Vorgänge in der Retina, dem Zielorgan der ERU, sind jedoch noch weitgehend unerforscht.

Die Müllerzellen, die Gliazellen der Retina, sind durch ihre besonderen strukturellen und funktionellen Glia-Neuron-Interaktionen von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der retinalen Struktur, sowie der Physiologie der Retina (Newman and Reichenbach 1996). Nahezu alle bekannten Retinopathien, wie diabetische Retinopathie, Makuladegeneration, Ischämie und Netzhautablösung führen zu einer Aktivierung von Müllerzellen, einer sogenannten Gliose (Bringmann and Reichenbach 2001). Während die früh in einer Erkrankung auftretende Gliose vorwiegend neuroprotektiv wirkt, kann diese in späteren Stadien auch schädigend für das retinale Gewebe sein und somit dessen Funktion beeinträchtigen (Bringmann et al. 2009a).

Bei der ERU weisen Müllerzellen die für eine Gliose charakteristischen morphologischen Veränderungen auf (Deeg et al. 2007a; Hauck et al. 2007). Mittels massenspektrometrischer Analyse eines gesunden und eines uveitischen Retinamembranproteoms wurden zudem auch Hinweise auf eine beeinträchtigte Funktionalität der Müllerzellen bei der ERU dokumentiert (Hauck et al. 2010). Besonders in komplexen Geweben wie der Retina liefern massenspektrometrische Proteomanalysen wertvolle Anhaltspunkte für die Charakterisierung der auf molekularer Ebene ablaufenden Prozesse (Lam et al. 2008).

Das Ziel dieser Studie war die Verifizierung und nähere Charakterisierung der bei der ERU auftretenden Gliose, um die Bedeutung der Müllerzelle für die Pathogenese der autoimmunen Uveitis zu bemessen und Aufschluss über Pathogenese-assoziierte Vorgänge in der Retina zu erlangen.

## **2 LITERATUR**

### **2.1 Equine rezidivierende Uveitis**

#### **2.1.1 Charakterisierung der ERU**

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine spontan auftretende, entzündliche Erkrankung des Pferdeauges, die durch ein immun-mediertes Geschehen charakterisiert ist (Deeg 2008; Gilger 2010; Gilger and Michau 2004). Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch eine akute und sehr schmerzhaft Entzündung, die typischerweise mit Blepharospasmus, Miosis und Photophobie einhergeht (Spiess 1997). Im Gegensatz zu anderen primären Erkrankungen des Auges, die sich auch in entzündlichen Veränderungen der Augenstrukturen äußern, ist die ERU durch akut wiederkehrende Entzündungsschübe, die sich mit Intervallen der Symptomlosigkeit abwechseln, charakterisiert (Gilger 2010). Dabei kann jeder erneute Schub im Schweregrad variieren, meist nimmt der Schweregrad mit steigender Anzahl der Schübe jedoch zu (Schwink 1992). Die wiederkehrende akute Inflammation führt zu irreversiblen pathologischen Veränderungen des okulären Gewebes, wobei der Grad der Läsionen sehr variabel und abhängig vom Krankheitsstadium ist (Rebhun 1979). Aufgrund des progressiven Verlaufs zeichnet sich das chronische Endstadium der Erkrankung durch den vollständigen Verlust der Sehfähigkeit des betroffenen Auges aus (Cook et al. 1983; Paglia et al. 2004; Rebhun 1979).

#### **2.1.2 Bedeutung in der Veterinärmedizin**

Die ERU ist in der Pferdepopulation weltweit verbreitet und tritt mit einer Prävalenz von 8-10% auf (Spiess 2010). Sie stellt die häufigste Ursache für den Verlust der Sehfähigkeit bei Pferden dar (Spiess 1997). Bei Gefahr ergreift das Pferd instinktiv die Flucht und ist dabei zur Orientierung auf sein visuelles Wahrnehmungsvermögen angewiesen. Ein von einer beidseitigen Erblindung betroffenes Pferd stellt daher eine potenzielle Gefährdung für sich selbst und seine Umwelt dar. Aufgrund dessen und der erheblichen Schmerzen und Leiden, die durch die immer wiederkehrende Entzündung entstehen, ist dann aus Tierschutzgründen die Euthanasie unabwendbar. Diese Auswirkungen der ERU verdeutlichen die Wichtigkeit der Erforschung von Pathogenese und Ätiologie dieser Erkrankung, um die Entwicklung einer kausalen Therapie zu ermöglichen.

### 2.1.3 Ätiologie und Pathogenese der ERU

Verschiedene Hypothesen wurden zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis aufgestellt, jedoch konnte bis heute keine vollständig bewiesen werden.

Durch die intensive Untersuchung der Pathogenese in den letzten Jahren der Forschung zeichnet sich ein immunmediertes Geschehen für diese Erkrankung deutlich ab (Deeg 2008; Gilger 2010). Für diese Hypothese sprechen nicht nur der rezidivierende Charakter der ERU und die deutlich positive Wirkung einer immunsuppressiven Therapie, sondern auch die Akkumulation von T-Zellen in ERU erkrankten Augen (Gilger 2010; Gilger et al. 1999; Spiess 2010). Das Auge stellt ein immun-privilegiertes Organ dar, das vom peripheren Immunsystem durch die Blut-Retina-Schranke abgeschirmt ist (Hori et al. 2010; Streilein 1990). Trotzdem überwinden T-Zellen, die in erster Linie als CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen identifiziert wurden (Gilger et al. 1999), diese Barriere und infiltrieren Iris, Glaskörper und Retina von uveitischen Augen (Deeg et al. 2002a; Kalsow and Dwyer 1998; Romeike et al. 1998). Diese zellmedierte Immunantwort zeichnet sich durch Autoreaktivität der infiltrierenden T-Zellen gegen körpereigene retinale Proteine aus (Deeg et al. 2001), wodurch die Netzhaut zum primären Angriffsziel in der ERU wird (Deeg et al. 2007b; Deeg et al. 2007c). Als Autoantigene bei der ERU konnten die Proteine Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP), S-Antigen (S-Ag) und zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP) verifiziert werden (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2006b; Deeg et al. 2002b).

Als Erklärung für den Ursprung und die Aufrechterhaltung der immer wiederkehrenden Entzündungsschübe dienen der Mechanismus der molekularen Mimikry (Zhao et al. 1998), die Bystander Aktivierung (Horwitz et al. 1998) und das Epitop Spreading (Miller et al. 1997; Vanderlugt and Miller 1996). Bei der Untersuchung der Immunreaktivität von T-Zellen von an ERU erkrankten und augengesunden Pferden gegen Epitope der Autoantigene IRBP und S-Ag konnte bei allen untersuchten Tieren mit ERU der Mechanismus des Epitop Spreadings für diese Autoantigene nachgewiesen werden (Deeg et al. 2006a). Diese Verschiebung der Immunreaktivität bietet eine aufschlussreiche Erklärung für die charakteristisch wiederkehrenden Entzündungsschübe im Krankheitsverlauf der ERU (Deeg et al. 2006a; Deeg et al. 2002b).

Die Analysen des Gesamtproteoms und des Membranproteoms der Netzhaut erbrachten den Beweis, dass von Seiten des Zielorgans vor allem auch retinale

Müller-Gliazellen Bedeutung bei der Aufrechterhaltung und für das Fortschreiten dieser Erkrankung haben (Hauck et al. 2010; Hauck et al. 2007).

#### **2.1.4 Histopathologie der Retina**

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis stellt die Retina das primäre Zielorgan dar, gegen dessen Proteine die Autoreaktivität gerichtet ist. Im Zuge histologischer Untersuchungen der hinteren Augenstrukturen von an ERU erkrankten Pferden konnten in allen Krankheitsstadien pathologische Veränderungen der Retina nachgewiesen werden (Deeg et al. 2002a).

Im Vergleich zu anderen Spezies ist die equine Retina weitgehend avaskulär (Schnitzer 1988) und weist nur in einem begrenzten Gebiet um den Sehnerv feine Blutgefäße auf (Ehrenhofer et al. 2002). In frühen Stadien der Erkrankung finden sich T-Zell-Infiltrate im Bereich der vaskularisierten Retina, während im weitaus größeren avaskulären Teil der Retina keine Infiltration nachgewiesen werden kann (Deeg et al. 2002a). Pathologische Veränderungen der Retina sind in diesem Stadium noch auf den Verlust der Photorezeptoraußensegmente begrenzt. Da diese Bereiche in engem Kontakt zur inneren oder äußeren Blut-Retina-Schranke stehen, spricht dies für die Invasion von T-Zellen über diese Strukturen. Im Verlauf der Krankheit weitet sich die T-Zell-Infiltration auf weitere Teile der Retina aus, wovon insbesondere die Nervenfaserschicht betroffen ist. Auch das erhöhte Ausmaß der Gewebeerstörung zeigt den progressiven Verlauf der ERU. Dabei löst sich nach und nach die gesamte Architektur der Retina auf, wobei Läsionen zunächst in der inneren Körnerschicht gefunden werden und dann auf die äußere Körnerschicht übergreifen. Bipolar- und Horizontalzellen sind in diesem Stadium weitgehend zerstört. Die einzige Zellart, die noch unvermindert vorkommt, jedoch eine gliotische Morphologie aufweist, sind die Müllerzellen. Das Endstadium der Erkrankung ist durch den vollkommenen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und die Entstehung eines massiven subretinalen Ödems gekennzeichnet, welches schließlich zur Ablösung der Retina führt (Deeg et al. 2002a).

## **2.2 Autoimmune Uveitis des Menschen und Tiermodelle**

Als Uveitis wird eine intraokuläre Entzündung bezeichnet, welche, ausgelöst durch infektiöse oder immunologische Vorgänge, durch die Extravasation von

---

mononukleären Zellen und Proteinen in die Strukturen der Uvea gekennzeichnet ist (Fiehn et al. 2003). Mit einer Prävalenz von 10% in der westlichen Welt stellt sie nach altersbedingter Makuladegeneration, Glaukom und diabetischer Retinopathie die vierthäufigste Ursache für Blindheit beim Menschen dar (Caspi 2010; Fiehn et al. 2003; Nussenblatt 1990). Der Schwerpunkt der Uveitisforschung liegt in der Untersuchung Pathogenese-assoziiierter Mechanismen (Wacker et al. 1977). Bislang wird bei der ERU, wie auch beim an Uveitis erkrankten Menschen, der Einsatz von lokal und systemisch wirkenden Immunsuppressiva bei nicht-infektiösen Ursachen als Methode der Wahl angesehen (Taylor et al. 2010).

Eine kausale Therapie der autoimmun-medierten Uveitis ist derzeit nicht vorhanden. Dies unterstreicht die Wichtigkeit und Bedeutung der Erforschung der Uveitis-Pathogenese, um langfristig eine spezifische Therapie entwickeln zu können. Allerdings ist die Gewinnung von intraokulärem Probenmaterial des Menschen äußerst schwierig und meist erst im Endstadium der Erkrankung möglich (Becker et al. 2000; Forrester 1991). Für die grundlegende Erforschung der Mechanismen, die zur Auslösung einer Uveitis führen, ist daher der Einsatz von Tiermodellen notwendig (Becker et al. 2000).

Experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) ist eine induzierte, T-Zell-medierte Autoimmunerkrankung und dient als Modell für humane entzündliche Augenerkrankungen autoimmuner Natur (Caspi et al. 1988). Mittels dieses Modells konnte die entscheidende Rolle bestimmter Autoantigene bei der Pathogenese der autoimmun-medierten Uveitis gezeigt werden (Gery and Streilein 1994).

Die EAU kann zum einen durch aktive Immunisierung (periphere Injektion) mit den retinaspezifischen Antigenen S-Ag oder IRBP, zum anderen durch adoptiven Transfer von sensibilisierten Lymphozyten induziert werden (Caspi et al. 1988; Gery et al. 1986a; Mochizuki et al. 1985; Wildner et al. 2008). Die Auslösung der EAU mit der subkutanen Injektion von S-Ag wurde bei Kaninchen, Meerschweinchen (Rao et al. 1979), Ratten (de Kozak et al. 1981) und Primaten (Nussenblatt et al. 1981) gezeigt. Bei Ratten (Gery et al. 1986b), Primaten (Hirose et al. 1987) und insbesondere bei Mäusen (Caspi et al. 1988) kann eine EAU zusätzlich durch Immunisierung mit IRPB hervorgerufen werden. Das EAU-Mausmodell kann nur durch IRPB generiert werden, die Injektion von S-Ag führt bei Mäusen nicht zu Uveitis (Caspi et al. 1990). Als adoptiven Transfer beschreibt man die Übertragung von *in vivo* sensibilisierten Lymphozyten auf ein Empfängertier. Diese Zellen werden

von einem mit dem Autoantigen immunisierten Donortier gewonnen und vor der Übertragung *in vitro* mit demselben Autoantigen reaktiviert (Mochizuki et al. 1985). Durch die radioaktive Markierung solcher Lymphozyten können diese nach 24 Stunden hauptsächlich in Leber, Milz, Thymus und Hoden des Empfängertiers nachgewiesen werden. Ein geringer Anteil dieser Zellen, der die Blut-Retina-Schranke überwindet, reicht aus, um eine Uveitis auszulösen (Palestine et al. 1986). Eine weitere Studie im EAU-Modell zeigte, dass nach adoptivem Transfer von  $10 \times 10^6$  S-Ag-spezifischen, radioaktiv markierten T-Zellen auf Lewis-Ratten eine detektierte Zellzahl von nur 160 Zellen in der Retina ausreichte um eine Uveitis auszulösen (Prendergast et al. 1998).

Keines der genannten EAU-Modelle kann die Erkrankung des Menschen vollständig repräsentieren, weshalb die Notwendigkeit besteht, verschiedene Modelle in der Forschung einzusetzen, um die Untersuchung der diversen Aspekte der Uveitis weitgehend abzudecken (Caspi 2010). Insbesondere die in verschiedenen Maus- (B10.RIII, B10.A, B10.BR) und Rattenlinien (Lewis, CAR, PVG) induzierte EAU, hat sich für die Uveitisforschung als geeignet erwiesen (Caspi 2003; Caspi et al. 2008; Wildner et al. 2008). Defizite dieser EAU Modelle bestehen jedoch darin, dass beispielsweise die EAU in der Lewis-Ratte stets monophasisch verläuft und sich Rezidive zwar in Mausmodellen manchmal dosisabhängig auslösen lassen, allerdings nicht vorhersagbar sind. Zudem ist bei keiner dieser Tierarten ein spontanes Auftreten von Uveitis bekannt. Somit mangelt es diesen Tiermodellen an der Möglichkeit die spontane Erkrankung mit der induzierten Uveitis zu vergleichen. Außerdem ist die elementare Untersuchung von auslösenden Mechanismen in einer induzierten Erkrankung nicht möglich, da das auslösende Agens bereits bekannt ist.

## **2.3 Bedeutung der ERU als Modell für autoimmune Uveitis**

### **2.3.1 Die ERU als spontanes Tiermodell**

Die ERU weist ein klinisches und pathologisches Erscheinungsbild auf, welches das der humanen Uveitis widerspiegelt (Hines 1984). Die Untersuchung der zugrundeliegenden immunpathologischen Mechanismen erbrachte Hinweise, dass es sich bei der ERU um eine autoimmun-medierte Erkrankung handelt (Deeg et al. 2001). In dieser Studie wurden Autoantikörper und spezifische T-Zellen gegen die Proteine S-Ag und IRPB in Glaskörperproben von an ERU erkrankten Pferden

gefunden (Deeg et al. 2001). Weitere Untersuchungen des Autoimmun-Repertoires von an ERU erkrankten Pferden führten zur Identifikation und Charakterisierung zusätzlicher Autoantigene (Deeg et al. 2006b). Auf dem retinalen Proteom wurden die Bindungsmuster von Autoantikörpern von gesunden und uveitischen Serumproben getestet und neue Kandidaten massenspektrometrisch identifiziert. CRALBP konnte dabei erstmals als Autoantigen charakterisiert werden und erwies sich als stark uveitogen im Pferd und in der Lewis-Ratte (Deeg et al. 2006b). Die Untersuchung von uveitischen Serumproben des Menschen auf Autoreaktivität gegen CRALBP bestätigte, dass auch bei Uveitispatienten häufig Immunreaktionen gegen dieses Autoantigen auftreten (Deeg et al. 2007c).

Die systematische Erforschung und der Vergleich verschiedener Proteome gesunder und erkrankter intraokulärer Gewebe ermöglichte zudem die Identifizierung differenziell regulierter Proteine, die Aufschluss über die Pathogenese-assoziierten Mechanismen in der ERU geben können (Deeg et al. 2007a; Deeg et al. 2008; Hauck et al. 2010; Hauck et al. 2007; Hofmaier et al. 2011). Die ERU ist neben der humanen Erkrankung die einzige Uveitis, die ein spontanes und rezidivierendes Auftreten zeigt, sogar in bereits erblindeten Augen (Kalsow et al. 1993). Eine Erklärung für die persistierenden Entzündungsschübe konnte durch die Untersuchung der Expression der bedeutendsten Autoantigene S-Ag, IRBP und CRALBP in verschiedenen ERU Krankheitsstadien gefunden werden (Deeg et al. 2007b). Die Expression dieser Autoantigene blieb trotz der weitgehenden Zerstörung retinaler Strukturen als Angriffsziel bestehen und zeigte teilweise sogar eine erhöhte Expression (Deeg et al. 2007b).

Parallelen zwischen der equinen und der humanen Uveitis, die Erkenntnisse die bisher durch die Erforschung der ERU gewonnen werden konnten und der Zugang zu equinem intraokulärem Probenmaterial verschiedenster Krankheitsstadien machen die ERU zu einem wertvollen und dem einzigen spontanen Modell für humane autoimmun-medierte Uveitis.

### **2.3.1 Die rezidivierende Uveitis beim Pferd als induzierbares Tiermodell**

Ein weiterer Vorteil der ERU ist der mögliche Abgleich der Erkenntnisse mit einem in der gleichen Spezies induzierbaren Uveitismodell (Deeg et al. 2008). Durch die periphere Injektion von Pferden mit dem Protein IRBP konnte erstmals ein Krankheitsbild hervorgerufen werden, das dem der spontan auftretenden ERU

entspricht (Deeg et al. 2002b). Besonders zeichnet sich dieses Modell durch die Re-induzierbarkeit von im zeitlichen Verlauf identisch wiederkehrenden Entzündungsschüben mittels wiederholter Injektionen von IRPB aus (Deeg et al. 2006b). Histologische Untersuchungen ergaben charakteristische Zerstörungsmuster der Retina, sowie lymphozytäre Infiltrationen der okulären Strukturen. Zudem gelang der Nachweis des Epitop Spreadings von IRPB sensibilisierten Lymphozyten auf S-Ag Epitope. Die Etablierung dieses induzierbaren Pferdmodells für Uveitis ermöglicht Pathogenese-assoziierte Studien im Vergleich zur spontanen Erkrankung und langfristig eventuell die Entwicklung therapeutischer Ansätze (Deeg et al. 2002b). Die Immunisierung von Pferden mit dem in Ratten und Mäusen uveitogen wirkenden Protein S-Ag konnte zwar eine spezifische B- und T-Zellantwort hervorrufen, jedoch entwickelten nur 20% der Tiere eine Uveitis (Deeg et al. 2004). Die Auslösung von Rezidiven durch wiederholte Immunisierung mit S-Ag war nicht möglich. Das klinische Bild der S-Ag induzierten Erkrankung beim Pferd entspricht nicht dem der spontanen Erkrankung. Somit hat S-Ag im Gegensatz zu IRBP nur ein schwaches, monophasisch uveitogenes Potenzial beim Pferd (Deeg et al. 2004).

Im Anschluss an die Identifizierung des Proteins CRALBP als Autoantigen in der spontan auftretenden Erkrankung wurde das uveitogene Potenzial im experimentellen Modell beim Pferd getestet (Deeg et al. 2006b). Die periphere Injektion dieses Proteins konnte bei allen getesteten Pferden eine Uveitis auslösen, welche sich jedoch im Vergleich zur IRPB und S-Ag induzierten Uveitis ausschließlich im hinteren Teil des Auges manifestierte und schwächere klinische Symptome hervorrief. Durch die wiederholte periphere Immunisierung mit CRALBP traten ebenfalls Rezidive auf (Deeg et al. 2006b).

Die experimentelle Induzierbarkeit der autoimmunen Uveitis einschließlich des rezidivierenden Charakters im Pferd, bestätigt nicht nur die Hypothese, dass die ERU eine Autoimmunerkrankung ist, sondern verdeutlicht auch den Wert dieses Tiermodells für die Erforschung der humanen Uveitis.

## **2.4 Die Müllerzelle und deren Bedeutung in der Retina**

Die Müllerzelle, die Neuroglia der Retina, wurde erstmals im Jahr 1851 vom deutschen Anatomen Heinrich Müller als Radialfaser der Netzhaut beschrieben (Müller 1851). Vorerst vermutete man eine vorherrschende Stütz- und Haltefunktion

dieser Zellart im zentralen Nervensystem (ZNS) und gab ihr daher den Namen Glia, was im griechischen Leim bedeutet (Virchow 1858). Erst im Verlauf der weiteren Forschung wurde die weit größere Bedeutung dieser Zellen im ZNS bekannt. Neben Müllerzellen zählen zwei weitere Gliazellarten, Astrozyten und Oligodendrozyten, zur Gruppe der Neuroglia. In der avaskulären Retina des Pferdes stellt die Müllerzelle jedoch die einzige Gliazellart dar (Schnitzer 1988). Daher eignet sich die equine Retina ganz besonders für Untersuchungen dieser Zellart.

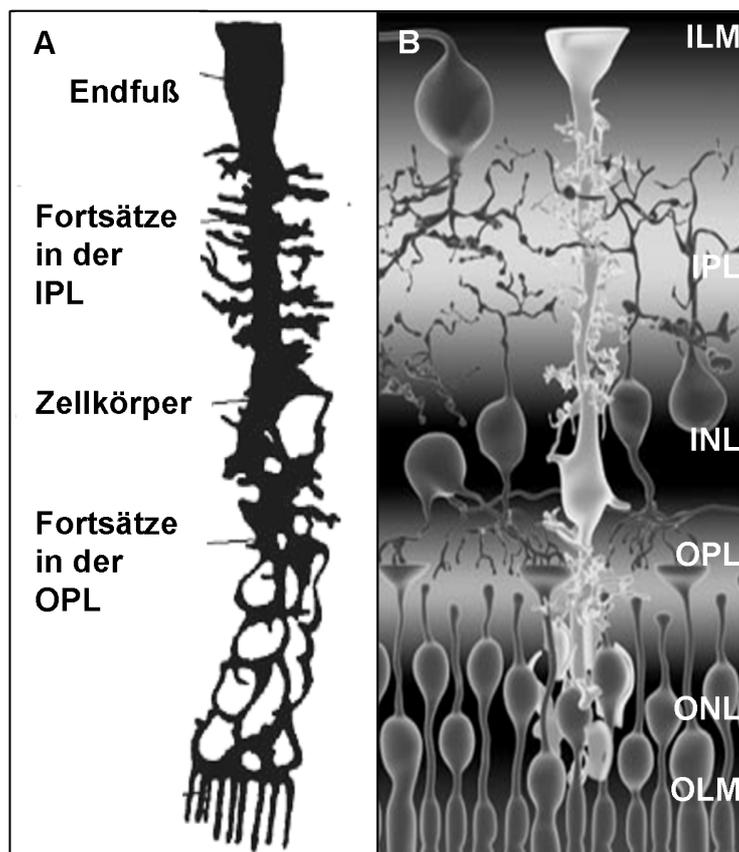
#### **2.4.1 Morphologische Bedeutung**

Die Müllerzelle durchzieht die gesamte Breite der Retina von der inneren limitierenden bis zur äußeren limitierenden Membran (Müller 1851). Von dem in der inneren Körnerschicht lokalisierten Zellkern zieht jeweils ein Stammfortsatz in Richtung der beiden Grenzschichten der Retina. Von diesen Stammfortsätzen zweigen in der inneren und äußeren plexiformen Schicht der Retina Sekundärfortsätze ab, welche die Synapsen in diesem Bereich ummanteln. In der Nervenfaserschicht ist der Stammfortsatz in Form eines so genannten Endfußes verbreitert, welcher letztlich den Kontakt zum Glaskörper darstellt. In der äußeren Retina teilt sich der Stammfortsatz in mehrere Zweige auf. Diese durchziehen die äußere Körnerschicht honigwabenartig, wobei sie die Zellkörper der Photorezeptoren umschließen (Abb. 1) (Bringmann et al. 2006; Newman and Reichenbach 1996; Reichenbach et al. 1988; Reichenbach et al. 1989; Reichenbach et al. 1993; Uga and Smelser 1973).

Diese charakteristische Morphologie der Müllerzelle stellt einen sehr engen Kontakt zu Zellkörpern und Fortsätzen der Neurone her und bildet mit diesen eine säulenartige Einheit (Reichenbach et al. 1993). Hierbei bildet eine Müllerzelle den Strukturkern für eine bestimmte Zahl von assoziierten Nervenzellen, die abhängig von Tierart und retinaler Lokalisation variiert (Reichenbach et al. 1989; Reichenbach and Wohlrab 1986). Diese Einheit bildet die anatomische und funktionelle Grundvoraussetzung für Neuron-Glia-Interaktionen. Des Weiteren stellt die Müllerzelle durch ihre Morphologie den Kontakt zu umgebenden Strukturen wie dem Glaskörper und dem subretinalen Raum her, mit welchen ein Austausch von verschiedensten Molekülen stattfindet (Bringmann et al. 2006). Müllerzellen besitzen aufgrund ihrer einzigartigen Morphologie auch die Eigenschaft der optischen Leitfähigkeit (Franze et al. 2007). Im Bezug auf die Optik stellt die Retina ein

invertiertes Organ dar, dessen Schichten das Licht vollständig durchdringen muss, um die lichtdetektierenden Photorezeptoren zu erreichen (Hammer et al. 1995; Vos and Bouman 1964). Um die Streuung des Lichtes und somit den Verlust der Intensität so gering wie möglich zu halten, leiten Müllerzellen das Licht durch die Retina und sorgen somit für deren Transparenz (Franze et al. 2007).

Somit offenbart die charakteristische Morphologie der Müllerzelle nicht nur deren Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung der retinalen Architektur, sondern auch ihre Bedeutung für die Funktion der Retina.



**Abb. 1:** Graphische Darstellung einer Müllerzelle. (A) Isolierte Müllerzelle. (B) Müllerzelle im retinalen Verband. Mit dem Endfuß grenzt die Müllerzelle im Bereich der inneren limitierenden Membran (ILM - inner limiting membrane) an den Glaskörper. Vom Stammfortsatz in der inneren Retina zweigen Sekundärfortsätze ab und umhüllen Synapsen in der inneren plexiformen Schicht (IPL – inner plexiforme layer). In der inneren Körnerschicht (INL – inner nuclear layer) ist der Zellkörper mit dem Zellkern lokalisiert. Sekundärfortsätze der äußeren plexiformen Schicht (OPL – outer plexiforme layer) stehen im Kontakt zu Synapsen der äußeren Retina. Im Bereich der äußeren Körnerschicht (ONL – outer nuclear layer) umschließen Müllerzelläste die Photorezeptoren honigwabenartig und münden an der äußeren limitierenden Membran (OLM – outer limiting membrane).

Modifizierte Abbildung nach Lu et al. und Bringmann et al. (Bringmann et al. 2006; Lu et al. 2006).

## 2.4.2 Physiologische Bedeutung

Müllerzellen verfügen über ein breites Spektrum an Funktionen, welche für die Aufrechterhaltung des neuronalen Metabolismus und der retinalen Physiologie maßgeblich von Bedeutung sind. Die Regulierung des retinalen Energiestoffwechsels, die Aufnahme und der Stoffwechsel von Neurotransmittern und die Aufrechterhaltung der retinalen Kalium- und Wasserhomöostase umfassen hierbei die wichtigsten dieser funktionellen Eigenschaften (Bringmann et al. 2006; Newman and Reichenbach 1996). Des Weiteren sind Müllerzellen am Aufbau und an der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke beteiligt (Tout et al. 1993). Zusätzlich wirken sie neuroprotektiv durch die Bereitstellung von Glutathion, das eine antioxidative Wirkung hat (Pow and Crook 1996). Durch die Expression von CRALBP binden Müllerzellen all-*trans*-retinal und konvertieren es zu 11-*cis*-retinol, um dieses den Photorezeptoren wieder zur Verfügung stellen zu können (Das et al. 1992).

### 2.4.2.1 Energiemetabolismus

Müllerzellen weisen einen spezialisierten Energiemetabolismus auf, welcher in erster Linie auf der anaeroben Glykolyse beruht. Als Endprodukt dieses Stoffwechselweges fällt dabei Laktat an, das von Enzymen der Gliazelle zu Pyruvat metabolisiert und über spezielle Transporter in den Extrazellulärraum freigesetzt wird (Lin et al. 1998; Poitry-Yamate et al. 1995; Poitry-Yamate and Tsacopoulos 1992; Tsacopoulos et al. 1998). Dieser Vorgang dient einerseits der Energiegewinnung der Nervenzellen selbst, welche Pyruvat als Substrat für ihren Citratzyklus benötigen (Poitry-Yamate et al. 1995), andererseits verhindert es eine laktatbedingte Ansäuerung des Zytoplasmas der Müllerzelle. Da Müllerzellen eine große Speicherkapazität für Glykogen und das Enzym Glykogenphosphorylase besitzen, kann diese metabolische Symbiose auch unter hypoglykämischen Bedingungen aufrechterhalten werden. (Kuwabara and Cogan 1961; Pfeiffer-Guglielmi et al. 2005). Die Glykogenolyse wird durch erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen stimuliert, welche durch neuronale Aktivitäten entstehen (Reichenbach et al. 1993). Dieser spezialisierte Energiemetabolismus erlaubt es Müllerzellen ihre Energie aus anaerober Glykolyse zu gewinnen und somit ihren Verbrauch an Sauerstoff auf einem sehr niedrigen Niveau zu halten (Winkler et al. 2000). Damit können sie, solange Glukose zur Verfügung steht, auch lange Phasen der Anoxie überstehen

---

und ihr metabolisches Zusammenspiel mit Nervenzellen aufrechterhalten (Winkler et al. 2000).

#### **2.4.2.2 Neurotransmitter Recycling**

Müllerzellen spielen eine wichtige Rolle bezüglich der Aufnahme und des Metabolismus von retinalen Neurotransmittern (Ehinger 1977). Glutamat, der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter der Retina (Thoreson and Witkovsky 1999), wird von Photorezeptoren, Bipolar- und Ganglienzellen zur Weiterleitung des Transmissionssignals in den synaptischen Spalt freigesetzt (Massey and Miller 1987; Massey and Miller 1990). Müllerzellen nehmen dieses freigesetzte Glutamat auf, um einerseits die Signaltransduktion zu beenden und andererseits einer Neurotoxizität vorzubeugen (Barnett and Pow 2000; Matsui et al. 1999). Um dies zu gewährleisten exprimieren Müllerzellen den elektrogenen,  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamat/Aspartat Transporter GLAST (Derouiche and Rauen 1995; Otori et al. 1994; Rauen et al. 1998), für dessen effektive Funktion ein sehr negatives Membranpotenzial erforderlich ist (Brew and Attwell 1987; Pannicke et al. 1994). Intrazellulär wandelt das Müllerzell-spezifische Enzym Glutamin Synthetase (GS) den Neurotransmitter Glutamat zu dessen Vorstufe Glutamin um (Derouiche and Rauen 1995; Linser and Moscona 1979; Riepe and Norenburg 1977). Nach der Regenerierung von Glutamin durch Müllerzellen steht dieses den Nervenzellen wieder als Substrat für die Neurotransmittersynthese zur Verfügung (Pow and Crook 1996).

#### **2.4.2.3 Regulation der retinalen Kalium- und Wasser Homöostase**

Im Zentralnervensystem sowie in der Retina entstehen lokale Änderungen der Kaliumkonzentration ( $[\text{K}^+]_o$ ) des Extrazellulärraumes in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität (Lux 1974). Änderungen der  $[\text{K}^+]_o$  beeinflussen das Ruhemembranpotenzial und führen somit zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Reaktionsfähigkeit (Newman et al. 1984). Müllerzellen regulieren die retinale  $\text{K}^+$ -Homöostase über einen Prozess, der sich  $\text{K}^+$ -Siphoning nennt (Newman et al. 1984). Dieser stellt einen modifizierten und effektiveren Mechanismus zum ursprünglich im ZNS beschriebenen  $\text{K}^+$ -spatial buffering dar (Orkand et al. 1966). Aktive Nervenzellen setzen insbesondere in den plexiformen Schichten der Retina  $\text{K}^+$ -Ionen frei und verursachen dadurch eine lokal erhöhte  $[\text{K}^+]_o$  im Extrazellulärraum (Steinberg et al. 1980). Dieser lokale Anstieg der  $[\text{K}^+]_o$  ruft eine treibende Kraft hervor, welche zum passiven Einstrom des freigesetzten Kaliums in die Müllerzelle führt. Dabei fungiert

die Müllerzelle als Abflusssystem für Kalium, indem gleichzeitig mit dem Einstrom eine äquivalente Menge Kalium in Räume niedriger  $[K^+]_o$  ausströmt. Diese als Abfluss dienenden Räume umfassen in der avaskulären Retina den Glaskörper und den subretinalen Raum und in der vaskulären Retina zusätzlich die angrenzenden retinalen Blutgefäße (Newman and Reichenbach 1996; Newman et al. 1984; Reichenbach et al. 1992). Die Membranen von Müllerzellen weisen eine sehr hohe Leitfähigkeit für Kalium auf, welche durch eine dichte Expression von speziellen Kalium-Kanälen gewährleistet ist (Newman 1985; Newman 1993). Insbesondere die Expression von einwärtsgleichrichtenden Kalium-Kanälen vom Typ Kir4.1 und Kir2.1, welche in der Retina ausschließlich in der Membran von Müllerzellen gefunden werden, ermöglicht die passiven Kaliumströme (Kofuji et al. 2002; Kofuji et al. 2000). Kir4.1 zeigt bei Ratte, Kaninchen und Maus eine starke Expression in Membranen von Müllerzell-Endfüßen, welche dem Glaskörper zugewandt sind, und in Müllerzellmembranen, die an Blutgefäße und den subretinalen Raum grenzen (Ishii et al. 1997; Kofuji et al. 2000; Nagelhus et al. 1999). Hingegen ist Kir2.1 entlang der gesamten Müllerzelle exprimiert (Kofuji et al. 2002). Das Expressionsmuster dieser Kanalproteine lässt erkennen, dass  $K^+$ -Ionen über das Kanalprotein Kir4.1 aus der Müllerzelle ausströmen, während der Einstrom von  $K^+$ -Ionen in die Müllerzelle hauptsächlich über den Kalium-Kanal vom Typ Kir2.1 gewährleistet wird (Kofuji et al. 2002). Die hohe  $K^+$ -Leitfähigkeit der Müllerzellmembran erzeugt dabei ein sehr negatives Ruhemembranpotenzial, das dem Gleichgewichtspotenzial von Kalium sehr nahe liegt und für die meisten Funktionen der Müllerzelle essenziell ist (Witkovsky et al. 1985).

Durch den Einstrom von Wasser mit osmotischen Substanzen oder aufgrund des intraokulären Drucks und der zusätzlich endogenen Produktion von Wasser im retinalen Gewebe, besteht die ständige Notwendigkeit dieses umzuverteilen, um der Entstehung eines Ödems vorzubeugen (Marmor 1999). Die transzelluläre Bewegung des Wassers ist dabei von der Wirkung osmotischer Substanzen, insbesondere von Ionen abhängig. Um den Fluss von Wasser über Membranen zu ermöglichen, ist die Expression von speziellen Wasserkanälen, den Aquaporinen, eine Grundvoraussetzung (Agre et al. 2002). In der Retina der Ratte exprimieren ausschließlich Müllerzellen das Kanalprotein Aquaporin 4 (AQP4) (Nagelhus et al. 1998), über welches Wasser in beide Richtungen passiv strömen kann. Der Fluss von Wasser ist dabei an die momentan herrschenden  $K^+$ -Ströme gekoppelt, was

durch die Ko-Expression von AQP4 und Kir4.1 ermöglicht wird (Nagelhus et al. 1999).

Diese vielfältigen Funktionen der Müllerzellen veranschaulichen deren besondere Bedeutung für die Struktur und Physiologie der Retina und für eine solide Reaktionsfähigkeit der retinalen Neurone.

Tierartlich bestehen morphologische sowie physiologische Unterschiede der Müllerzellen insbesondere zwischen Spezies mit vaskulären (wie beispielsweise Maus, Ratte und Mensch) und avaskulären (wie beispielsweise Pferd und Kaninchen) Retinae (Dreher et al. 1992; Newman 1987; Yu and Cringle 2001).

## **2.5 Müllerzell-Gliose**

Der Begriff Gliose beschreibt den aktivierten und veränderten morphologischen, physiologischen und biochemischen Zustand von Gliazellen und scheint ein zellulärer Versuch, das Ausmaß der Gewebeschädigung so gering wie möglich zu halten und somit dessen Funktion weitestgehend zu erhalten (Liberto et al. 2004). Gliotische Veränderungen der Müllerzellen wurden in nahezu allen untersuchten Erkrankungen beschrieben, die zu pathologischen Veränderungen der Netzhaut führen. Eine Müllerzell-Gliose tritt dabei sowohl als Folge von traumatisch bedingten Schädigungen als auch bei Glaukom, diabetischer Retinopathie, altersbedingter Makuladegeneration, retinaler Ischämie, Netzhautablösung und Uveitis auf (Bringmann et al. 2006; Bringmann and Reichenbach 2001).

Die früh nach initialer Schädigung auftretende Gliose ist durch unspezifische Reaktionen gekennzeichnet, welche unabhängig vom auslösenden Faktor sind. Andere Reaktionen der Müllerzelle werden durch spezifische Impulse hervorgerufen und sind abhängig von der Erkrankung oder Schädigung der Retina (Bringmann et al. 2006).

Die Steigerung der Expression der Intermediärfilamente Glial fibrillary acidic protein (GFAP) und Vimentin stellen hierbei die sensitivsten unspezifischen Müllerzell-Reaktionen dar und dienen somit als Marker für eine frühe reaktive Gliose (Bignami and Dahl 1979; Bringmann and Reichenbach 2001). Die Störung des Neurotransmitter-Metabolismus, welcher durch eine geänderte Expression des Schlüsselenzyms Glutamin Synthetase (GS) gekennzeichnet ist, zählt zu den wichtigsten spezifischen Reaktionen (Bringmann et al. 2009b). Eine verminderte

Expression von GS wurde in durch Licht geschädigten Retinae, nach Netzhautablösungen und bei uveitischen Retinae beschrieben (Grosche et al. 1995; Hauck et al. 2007; Lewis et al. 1989). Hierbei kann freigesetztes Glutamat nicht regeneriert werden und wirkt mit steigender Konzentration neurotoxisch. Durch die traumatische Schädigung der Retina nach Erhöhung des intraokulären Drucks fand man kaum eine Änderung der Expression von GS (Woldemussie et al. 2004), während sogar eine erhöhte Expression bei hepatischer Retinopathie aufzufinden war (Reichenbach et al. 1995).

Zum Schutz des neuronalen Gewebes während eines pathologischen Geschehens sezernieren Müllerzellen neurotrophe Substanzen (z.B. CNTF, BDNF, PEDF u.a.), Wachstumsfaktoren (wie bFGF, NGF u.a.) und Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  u.a.), wodurch das Überleben von Nervenzellen und Photorezeptoren unterstützt wird (Dicou et al. 1994; Eichler et al. 2004; Hauck et al. 2007; Joly et al. 2007; Morimoto et al. 2005; Seki et al. 2005; Tezel and Wax 2000; Walsh et al. 2001; Wilson et al. 2007; Zhang et al. 2006).

Des Weiteren bietet die Sekretion von Antioxidantien, insbesondere von Gluthation, den Neuronen Schutz vor oxidativem Stress (Schutte and Werner 1998).

Unter pathologischen Bedingungen, insbesondere nach dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, wird Müllerzellen auch eine immunmodulatorische Wirkung zugeschrieben (Caspi and Roberge 1989). Müllerzellen können unter inflammatorischen Bedingungen unter anderem MHC Klasse II Moleküle exprimieren und somit als antigenpräsentierende Zellen fungieren (Kim et al. 1987), die Proliferation von T-Helferzellen inhibieren (Chan et al. 1991) und Rezeptoren für Komplementfaktor C3a exprimieren (Vogt et al. 2006).

Die Konsequenzen im weiteren Verlauf der Gliose machen sich durch die veränderte Müllerzell-Physiologie bemerkbar. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die reduzierte Leitfähigkeit der Müllerzell-Membranen für K<sup>+</sup>-Ionen, verursacht durch die verminderten Expression von Kir-Kanälen (Bringmann et al. 2000). Die dadurch gestörte Regulation der retinalen Kaliumhomöostase hat auch Auswirkungen auf die an sie gekoppelte Regulation des Wasserhaushaltes der Retina. Dies ist deutlich in der Entstehung von retinalen Ödemen und der veränderten Expression des Wasserkanals AQP4 erkennbar (Iandiev et al. 2008). Als Konsequenz depolarisiert das überaus negative Ruhemembranpotenzial der Müllerzelle, welches für viele Funktionen der Zelle essenziell ist (Tenckhoff et al. 2005). Außerdem scheint diese

Depolarisation die Grundvoraussetzung für den Wiedereintritt der Müllerzelle in den Proliferationszyklus zu sein (Bringmann et al. 2000).

Während bei der sogenannten konservativen Gliose die oben genannten Mechanismen variieren können, kann die Gliose mit dem Fortschreiten der Erkrankung schließlich in eine proliferative Form übergehen (Bringmann et al. 2006). Diese ist durch Proliferation und Migration von Müllerzellen gekennzeichnet, wobei gliotisches Narbengewebe entsteht. Dadurch behindern Müllerzellen das Nervengewebe bei der Regeneration und bestimmen somit das Ausmaß des Visusverlustes (Bringmann et al. 2009a).

Es wird deutlich, dass eine Gliose einerseits ein komplexes Bestreben darstellt, den Gewebeverband vor weiterer Schädigung zu schützen, jedoch andererseits eine Schädigung für die Neurone bedeutet, da die gliotische Müllerzelle ihre unterstützenden Funktionen nicht aufrechterhalten kann (Bringmann et al. 2009a).

## **2.6 Gliose und Uveitis**

Müllerzellen spielen auch im Verlauf und im Fortschreiten der equinen rezidivierenden Uveitis eine bedeutende Rolle. Dies wurde bereits durch die Untersuchung der charakteristischen morphologischen Veränderungen der gliotischen Müllerzelle in Retinae von an ERU erkrankten Pferden beschrieben. Hierbei zeigten Müllerzellen in uveitischen Retinae eine vermehrte Expression der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin. Zudem konnte eine reduzierte Expression von GS bei der ERU gezeigt werden (Hauck et al. 2007). Aufgrund der nachgewiesenen Expression des proinflammatorischen Zytokins INF $\gamma$  an gliotischen Müllerzellen wurde diesen auch eine immunmodulatorische Wirkung bei der ERU zugeschrieben (Deeg et al. 2007a; Hauck et al. 2007). Außerdem scheint die aktivierte Müllerzelle durch die Expression von MHC II Molekülen bei der ERU auch als antigenpräsentierende Zelle zu wirken (Romeike et al. 1998). Neueste massenspektrometrische Studien des Retina-Membranproteoms geben Hinweise auf weitere Veränderungen der Müllerzelle bei der ERU, wie sie für eine Gliose charakteristisch sind und auch bei anderen Erkrankungen der Retina beschrieben wurden (Hauck et al. 2010). Bei diesem Vergleich des Retina-Membranproteoms von gesunden und an ERU erkrankten Pferden wurden Unterschiede in der Expression von Müllerzell-spezifischen Kaliumkanälen und Aquaporinen gefunden. Während das

für die Kalium-Homöostase wichtigste Membranprotein Kir4.1 ein stark reduziertes Auftreten zeigte, wurde eine erhöhte Expression des Wasserkanals Aquaporin 4 gefunden. Diese Befunde deuten auf eine gestörte retinale Kalium- und Wasserhomöostase hin (Hauck et al. 2010). Die Expression von Müllerzell-spezifischen Kanalproteinen bei der Uveitis wurde noch nicht umfassend erforscht. Bislang gibt es aus zwei induzierten Uveitis-Modellen Anhaltspunkte für eine auftretende Gliose bei der Uveitis, die eine verminderte Expression von Kir4.1 und zumindest einen vorübergehenden Verlust von AQP4 involviert. Eine stark verminderte Expression von Kir4.1 wurde in Retinae von Ratten mit endotoxin-induzierter Uveitis nachgewiesen (Pannicke et al. 2005). Eine weitere Studie bei derselben experimentell induzierten Uveitis konnte ebenfalls eine reduzierte Kir4.1 Expression zeigen und zusätzlich eine initiale Reduktion von AQP4, die 14 Tage nach Induktion der Uveitis wieder auf das Niveau von Kontrolltieren anstieg (Liu et al. 2007). Von einem Verlust der AQP4 Expression in der Müllerzelle wurde außerdem in einer immunhistochemischen Studie bei der in der Mauslinie C57Bl6 induzierten EAU, mittels Injektion von IRBP, berichtet (Motulsky et al. 2010).

## **2.7 Proteomik**

Die Proteomik umfasst die Erforschung des Proteoms. Dieses setzt sich aus der Gesamtheit aller in einem Organismus oder Gewebe unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine zusammen (Wilkins et al. 1996a; Wilkins et al. 1996b). Das Proteom ist hochdynamisch, denn es kann sich in seiner quantitativen und qualitativen Zusammensetzung in Abhängigkeit von veränderten physiologischen und pathologischen Bedingungen ständig verändern (Apweiler et al. 2009). Wesentliche Teilgebiete der Proteomik sind die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und die quantitative und qualitative Analyse der Proteinexpression. Insbesondere die differenzielle Proteomanalyse, welche die Proteome verschiedener biologischer Zustände vergleicht, ermöglicht einen umfassenden Einblick in die Änderung von Proteinexpressionsmustern unter bestimmten Bedingungen (Beck et al. 2011). Somit können durch diese Nicht-Hypothesen getriebenen Vergleiche von gesundem und erkranktem Gewebe, differenziell exprimierte Proteine detektiert und damit Pathogenese-assoziierte Signalwege aufgedeckt werden (Hauck et al. 2007).

Von besonderer Bedeutung ist die massenspektrometrisch basierte Proteomik, welche eine überaus effektive Methode zur Untersuchung und zum Vergleich biologischer Zustände darstellt und bereits zu einigen bahnbrechenden Entdeckungen in der Wissenschaft führte (Cox and Mann 2007).

### **2.7.1 Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Technik durch die bereits seit über einhundert Jahren bedeutende Entdeckungen auf den Gebieten der Pharmazie, der Biologie und der Medizin gewonnen werden (Borman et al. 2003). Auch in der Proteomik ist sie zu einem unverzichtbaren Werkzeug geworden, da sie eine schnelle Analyse und Identifizierung von Proteinen ermöglicht (Canas et al. 2006; Henzel et al. 1993).

Mit einem Massenspektrometer lassen sich ionisierte Peptide oder Proteine in Abhängigkeit von ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) durch in einem Vakuum integrierte, elektrische oder magnetische Felder separieren. Diese Felder beeinflussen die räumliche Flugbahn, die Geschwindigkeit und die Richtung der Ionen. Der anschließende Vergleich detektierter Massenspektren der ionisierten Peptide mit Proteinsequenzdatenbanken unter Verwendung von Software-Programmen wie MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) erlaubt deren Identifikation (Perkins et al. 1999).

Die wichtigsten Komponenten des Massenspektrometers umfassen Ionenquelle, Analysator und Detektor (Canas et al. 2006). Als Ionenquelle finden Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) (Karas and Hillenkamp 1988) oder Elektrospray Ionisation (Fenn et al. 1989) Anwendung. In der Proteomik werden zur Analyse in erster Linie Flugzeit- (time-of-flight, TOF), Quadrupol- oder Ionenfallen-Massenspektrometer eingesetzt (Cotter et al. 2005; Yates 2004). Während Letztere meist mit einer Elektrospray Ionisation gekoppelt sind, findet man Flugzeit-Massenspektrometer meist in der Verbindung mit einer MALDI Ionenquelle (MALDI-TOF) (Canas et al. 2006).

Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnet die Verbindung von mehreren hintereinander geschalteten Analysatoren, was die Selektivität der Methode maßgeblich erhöht (Dongre et al. 1997). Dabei sind verschiedene Kombinationen, wie beispielsweise zwei hintereinander geschaltete Flugzeit-Massenspektrometer (TOF/TOF) oder auch die Kombination von Ionen- und Quadrupol-

Massenspektrometern möglich (Geiger et al. 2010; Levander and James 2005; Medzihradzky et al. 2000; Shevchenko et al. 2000).

### **2.7.2 LC-MS/MS und LTQ Orbitrap**

Um die Analyse von sehr komplexen proteomischen Proben zu verbessern, wird der Massenspektrometrie eine Flüssigkeitschromatographie (LC) vorangestellt. Die Kombination aus Massenspektrometrie und LC wird als LC-MS/MS bezeichnet, kann in einem Lauf mehr als 1000-2000 Proteine identifizieren und stellt momentan die am häufigsten verwendete Technologie zur Analyse von komplexen Proteomen dar (Beck et al. 2011). Hierbei werden die Proteine zuerst enzymatisch verdaut, wodurch kleinere Peptidfragmente erhalten werden, und dann über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) weiter aufgetrennt. Die dabei entstehenden Fraktionen werden durch MALDI oder Elektronenspray separiert und ionisiert und dann den nachgestellten Massenspektrometern zur Analyse zugeführt (Chen and Pramanik 2008).

Die ständige Weiterentwicklung von LC-MS/MS Systemen ermöglicht mittlerweile die fortwährende Analyse von komplexen biologischen Proben und führt zu einer immer besser werdenden Aufschlüsselung verschiedenster Proteome. Dies lässt sich äußerst anschaulich anhand der proteomischen Analyse von Eiweiß verdeutlichen (Mann and Mann 2011). Während erste massenspektrometrische Ansätze (MALDI-TOF) lediglich zur Identifikation von 7 Proteinen führten, konnten mit ersten Tandem-Systemen schon 16 Proteine identifiziert werden (Guerin-Dubiard et al. 2006). Durch die Weiterentwicklung der Massenspektrometrie gelang es bereits ein Jahr später, 78 verschiedene Proteine im Eiweiß zu bestimmen (Mann 2007). Neueste Analysen von Eiweiß, die unter Verwendung eines LTQ Orbitrap Hybrid-Massenspektrometers durchgeführt wurden, führten zur Identifikation von 158 Proteinen (Mann and Mann 2011).

Die LTQ Orbitrap ist ein kommerziell erhältliches Hybrid-System das zu einem bedeutenden Werkzeug in der Proteomik geworden ist, da es extrem genaue Massenmessungen bei gleichzeitiger sehr hoher Massenauflösung ermöglicht (Olsen et al. 2009). Es beinhaltet ein neuartiges Analysatorkonzept (Orbitrap), welches auf einer elektrostatischen Ionenfalle beruht (Makarov 2000). Bei diesem System werden über eine HPLC aufgetrennte Proteine mittels einer Elektro- oder Nanosprayionisierung ionisiert, um dann in ein Tandem-Massenspektrometer zur

Analyse eingespeist zu werden (Scigelova and Makarov 2006). Dieses setzt sich aus einer linearen Ionenfalle, einem C-Trap und der Orbitrap zusammen. Die erste Ionenfalle zeichnet sich durch ihre extrem hohe Sensitivität bei geringer Massenauflösung und -genauigkeit aus. In dieser Falle gesammelte Ionen werden in die C-Trap transferiert und dort vorübergehend gespeichert und komprimiert. Der letzte Teil der LTQ Orbitrap stellt die Orbitrap selbst dar (Scigelova and Makarov 2006). Hier umkreisen die Ionen eine axiale Elektrode wobei sie gleichzeitig und mit einer zum Masse/Ladungs-Verhältnis umgekehrt proportionalen Frequenz oszillieren. Diese Oszillation induziert abhängig von der Frequenz Spiegelströme, welche detektiert und in ein Massenspektrum transformiert werden (Makarov 2000). Dieses System hat einen bedeutenden Beitrag auf dem Gebiet der Proteomik geleistet (Scigelova and Makarov 2006).

### **2.7.3 Quantitativ vergleichende Proteomanalyse**

Ein wichtiger Ansatz in der Proteomik ist der quantitative Vergleich von Proteinen verschiedener biologischer Zustände, um den Effekt eines Stimulus auf das biologische System zu untersuchen (Canas et al. 2006). Dabei stellt insbesondere die Identifizierung von qualitativen und quantitativen Veränderungen des Proteoms im Bezug auf eine Erkrankung ein bedeutendes Gebiet in der Forschung dar (Wiener et al. 2004). Anfangs wurden diese Analysen über die 2-Dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) mit anschließender Identifikation von differenziell regulierten Proteinen im Massenspektrometer durchgeführt (Lilley and Friedman 2004). Diese Technik ist jedoch sehr Zeit- und Arbeitsaufwendig, wenig dynamisch und unzureichend für die Analyse von sehr großen und kleinen oder auch unlöslichen Proteinen, wie beispielsweise Membranproteinen (Canas et al. 2006). Daher kommt heutzutage hauptsächlich die nicht-gelbasierte Massenspektrometrie mit anschließender Quantifizierung zum Einsatz (Grossmann et al. 2010). Diese Quantifizierung kann auf der Markierung der Peptide oder Proteine mit einem Label (nicht-radioaktives Isotop) oder auf Label-freien Methoden basieren (Butler et al. 2010; Winefield et al. 2009). Die relativ unkomplizierte Aufbereitung der Proben und die geringen Kosten der Label-freien Technologie im Vergleich zu labelbasierten Ansätzen machen diese Methode für die Forschung sehr attraktiv (Grossmann et al. 2010).

## 2.8 Bedeutung von Membranproteinen

Membranproteine stellen eine bedeutende Gruppe von Proteinen dar und machen nahezu 30% des Gesamtproteoms aus (Stevens and Arkin 2000). Durch ihre vielfältigen Funktionen spielen sie eine fundamentale Rolle bei biologischen Prozessen. Sie sind maßgeblich an der Kommunikation und Interaktion von Zellen, an der Abgrenzung von Kompartimenten und am Transport von Ionen und gelösten Substanzen beteiligt (Wu and Yates 2003). Durch ihre Präsenz an der Zelloberfläche bieten sie das Angriffsziel für mehr als zwei Drittel der bekannten Therapeutika (Arinaminpathy et al. 2009). Änderungen des Membranproteoms führen nicht nur zu Fehlfunktionen der Zelle, sie tragen auch zur Auslösung und Pathogenese von Krankheiten bei (Macher and Yen 2007).

Daher ist das Interesse an der weiteren Aufschlüsselung des Membranproteoms unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen wesentlich gestiegen (Hamacher and Meyer 2005). Die systematische Analyse von Membranproteinen birgt jedoch einige Schwierigkeiten in Bezug auf die Probenverarbeitung, da diese Proteine durch ihre Lokalisation in Zellmembranen aus hydrophilen und hydrophoben Anteilen bestehen und deshalb schlecht löslich sind (Grant and Wu 2007). Spezielle Protokolle zur Aufbereitung und Anreicherung von Membranproteinen und die Weiterentwicklung von gel-freien LC-MS/MS Systemen erleichtern die Analyse von Membranproteinen inzwischen bedeutend (Wu and Yates 2003).

## 2.9 Primärkultur und Zelllinien

Die primäre Zellkultur entsteht durch die Isolierung von Zellen aus Flüssigkeit, Gewebe oder Organen und hat eine limitierte Lebensdauer unter *in vitro* Bedingungen (Schaeffer 1990). Je nach Zellart, Gewebe und Organismus unterscheiden sich die Isolationstechniken und die Bedingungen, unter welchen Primärzellen in Kultur gehalten werden können. Primärkulturen zeichnen sich dadurch aus, dass im Verlauf der Kulturzeit typische Veränderungen auftreten. Im Wesentlichen verringert sich zuerst die Teilungsrate, bis die Zellen schließlich völlig in die Seneszenz übergehen (Hayflick and Moorhead 1961).

Eine Primärkultur wird ab der ersten erfolgreichen Passage als Zelllinie bezeichnet und zeichnet sich durch eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit aus (Schaeffer 1990).

Diese erlangt sie entweder durch spontane Immortalisierung oder durch Transformation mittels verschiedener Techniken wie beispielsweise die Infektion mit einem Virus (Cairns et al. 2003) oder Transfektion mit dem Enzym Telomerase (Zongaro et al. 2005).

In der Wissenschaft werden Primärzellen in erster Linie zur Erforschung von grundlegenden physiologischen Prozessen eingesetzt, da sie *in vitro* die meisten Eigenschaften und Charakteristika ihres Zelltyps *in vivo* repräsentieren. Der Einsatz von Zelllinien in der Wissenschaft ist heutzutage nicht mehr wegzudenken. So werden Zellkultursysteme routinemäßig sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der Stammzellforschung eingesetzt (Palmer et al. 2001). Auch in den Neurowissenschaften hat die Etablierung von neuronalen Zellkulturen und -linien einen bedeutenden Fortschritt für die Forschung geleistet (Banker and Goslin 1988). Zelllinien stehen heutzutage nicht nur von nahezu jedem physiologischen Zelltyp und vielen Spezies zur Verfügung, auch kommen beispielsweise die verschiedensten Tumorzelllinien in der Krebsforschung zum Einsatz (Perez-Escuredo et al. 2011; Takasaki et al. 2007). Viele dieser Zelllinien sind in Datenbanken gespeichert und können von diesen bezogen werden (Healy et al. 2005; Vogel 2002). Allein in der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen sind derzeit 667 Zelllinien humaner und tierischer Herkunft verfügbar (<http://www.dsmz.de/>).

Die Etablierung von Zellkultursystemen und somit die Möglichkeit Experimente *in vitro* durchzuführen haben entscheidende Bedeutung beim Ersatz von Tierversuchen. Der Einsatz von Versuchstieren konnte durch die Verfügbarkeit von Zelllinien und Primärzellkulturen drastisch reduziert werden (Festing and Wilkinson 2007).

### **3 PUBLIKATION I**

#### **Titel**

“Differential expression of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Müller glial cell-dependent ion and water homeostasis”

#### **Autoren**

**Christina Eberhardt**, Barbara Amann, Annette Feuchtinger, Stefanie M. Hauck und Cornelia A. Deeg

#### **Journal**

GLIA

Glia. 2011 May; 59(5):697-707. doi: 10.1002/glia.21139.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.21139/abstract>



# Differential Expression of Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channels and Aquaporins 4 and 5 in Autoimmune Uveitis Indicates Misbalance in Müller Glial Cell-Dependent Ion and Water Homeostasis

CHRISTINA EBERHARDT,<sup>1</sup> BARBARA AMANN,<sup>1</sup> ANNETTE FEUCHTINGER,<sup>2</sup> STEFANIE M. HAUCK,<sup>3</sup> AND CORNELIA A. DEEG<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Sciences, Institute of Animal Physiology, Ludwig-Maximilians University, München, Germany

<sup>2</sup>Institute of Pathology, Helmholtz Zentrum München-German Research Center for Environmental Health (GmbH), Neuherberg, Germany

<sup>3</sup>Department of Protein Science, Helmholtz Zentrum München-German Research Center for Environmental Health (GmbH), Neuherberg, Germany

## KEY WORDS

Kir channels; aquaporin 5; glial swelling; spontaneous autoimmune disease; quantitative image analysis

## ABSTRACT

Reactive gliosis is a well-established response to virtually every retinal disease. Autoimmune uveitis, a sight threatening disease, is characterized by recurrent relapses through autoaggressive T-cells. The purpose of this study was to assess retinal Müller glial cell function in equine recurrent uveitis (ERU), a spontaneous disease model resembling the human disease, by investigating membrane proteins implicated in ion and water homeostasis. We found that Kir2.1 was highly expressed in diseased retinas, whereas Kir4.1 was downregulated in comparison to controls. Distribution of Kir2.1 appeared Müller cell associated in controls, whereas staining of cell somata in the inner nuclear layer was observed in uveitis. In contrast to other subunits, Kir4.1 was evenly expressed along equine Müller cells, whereas in ERU, Kir4.1 almost disappeared from Müller cells. Hence, we suggest a different mechanism for potassium buffering in the avascular equine retina and, moreover, an impairment in uveitis. Uveitic retinas showed significantly increased expression of AQP4 as well as a displaced expression from Müller cells in healthy specimens to an intense circular expression pattern in the outer nuclear layer in ERU cases. Most interestingly, we detected the aquaporin family member protein AQP5 to be expressed in Müller cells with strong enrichments in Müller cell secondary processes. This finding indicates that fluid regulation within the equine retina may be achieved by an additional aquaporin. Furthermore, AQP5 was significantly decreased in uveitis. We conclude that the Müller cell response in autoimmune uveitis implies considerable changes in its potassium and water physiology. ©2011 Wiley-Liss, Inc.

neuronal cell function as well as the maintenance of retinal integrity (Newman and Reichenbach, 1996). Gliosis is a well-established response to virtually every retinal disease (Bringmann et al., 2006) comprising inflammatory pathologies such as autoimmune uveitis. Characteristic changes of gliotic Müller cells display unspecific morphological changes, such as increased expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) and alteration in the expression of glutamine synthetase (GS), that demonstrates their impaired biochemical and physiological function resulting in a disrupted neuron–glia interaction (Bringmann et al., 2006; Hauck et al., 2007). Studies on endotoxin-induced uveitis in rats revealed short-term alterations in Müller cell physiology (Liu et al., 2007; Pannicke et al., 2005). Furthermore, retinal glial cells are involved in the pathogenesis of recurrent autoimmune uveitis of the horse, a major sight-threatening disease (Hauck et al., 2007). Equine recurrent uveitis (ERU) is characterized by activated autoaggressive T-cells, which cross the blood–retinal barrier and attack the inner eye. These invading T-cells are specific for several retinal autoantigens (Deeg et al., 2001, 2006). ERU provides a reliable disease to study autoimmune uveitis-related pathomechanisms (Deeg, 2009), as ERU develops frequently and is the only disease model that occurs spontaneously. In course of the disease, recurring relapses expedite tissue destruction and ultimately lead to loss of vision in horses (Zipplies et al., 2009) just like in patients (Forrester, 1991). A novel pathogenesis-relevant uveitis autoantigen, CRALBP, was first discovered in ERU (Deeg et al., 2006)

## INTRODUCTION

Retinal Müller glial cells are the main macroglial cells in the retina providing essential functions to support neurons with respect to structure, nutrition, and metabolism (Newman and Reichenbach, 1996). Therefore, they are deeply involved in physiological processes related to

Stefanie M. Hauck and Cornelia A. Deeg contributed equally to this work.

Grant sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft—DFG; Grant number: SFB 571/A5, DE 719/2-2.

\*Correspondence to: Cornelia A. Deeg, Department of Veterinary Sciences, Institute of Animal Physiology, Ludwig-Maximilians University, Veterinärstr. 13, 80539 München, Germany. E-mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

Received 22 September 2010; Accepted 15 December 2010

DOI 10.1002/glia.21139

Published online 8 February 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

and proved subsequently to be important for the human disease as well (Deeg et al., 2007).

ERU is particularly qualified to investigate the participation of Müller glial cells in the pathogenesis of uveitis as these cells constitute the only macroglial cells in the avascular equine retina (Schnitzer, 1988). Some characteristic gliotic Müller cells changes along with expression of interferon-gamma in ERU were already detected in a previous study (Hauck et al., 2007).

Major Müller cell functions comprise neurotransmitter recycling, glucose metabolism, and regulation of retinal homeostasis (Reichenbach et al., 1993). The latter includes  $K^+$  and water homeostasis. For this purpose, Müller cells are endowed with inwardly rectifying  $K^+$  (Kir) channels and aquaporins (Kofuji et al., 2000; Nagelhus et al., 1998; Newman, 1993). Potassium channels Kir4.1 and Kir2.1 are known to be the main mediators of  $K^+$  fluxes and are consequently responsible for the most widely accepted  $K^+$  spatial buffering (Kofuji et al., 2002). Within the retina, this process has been termed  $K^+$  siphoning, whereby neuronally released  $K^+$  ions are directed from locations of elevated  $K^+$  concentration ( $[K]_o$ ) to different extracellular sinks (Newman and Reichenbach, 1996; Newman et al., 1984; Reichenbach et al., 1992). Retinal water fluxes across Müller cell membranes are mediated by AQP4, the predominant water channel in the central nervous system (Nagelhus et al., 1998, 2004). Kir4.1 and AQP4 were found coexpressed in certain rat Müller cell membrane domains that led to the suggestion of a functional-dependent relationship (Nagelhus et al., 1999). As  $K^+$  and fluid regulation are the most important and best-established assignments of Müller cells, it is important to assess their function in autoimmune uveitis, where misbalance of functional ion and water homeostasis could contribute to glial cell swelling and neuronal cell death (Bringmann et al., 2006).

In a recent study, we found that Kir4.1 and AQP4 were differentially expressed in the retina membrane protein fraction of an ERU case compared with a healthy retinal specimen (Hauck et al., 2010). Moreover, expression of another aquaporin family member, AQP5, was detected in retinal tissue (Hauck et al., 2010). The goal of this study was to evaluate these membrane channels in the equine avascular and uveitic retina to gain further insight in the response of Müller cells in autoimmune uveitis with a special focus on aquaporin 5.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection and Preparation of Healthy and ERU-Diseased Eye Samples

#### Collection

For this study, a total of 30 ERU-diseased samples and 22 healthy controls were collected and processed. ERU specimens were derived from horses that were treated in the equine clinic and diagnosed with ERU according to clinical criteria as described (Deeg et al., 2008). All animals either had to be euthanized because

of a cause unrelated to this study (control eyes) or were enucleated during a therapeutical procedure. Horses were treated according to the ethical principals and guidelines for scientific experiments on animals according to the ARVO statement for the use of animals in Ophthalmic and Vision Research. No experimental animals were involved in this study.

#### Preparation

Collected samples were processed immediately after enucleation. For SDS-PAGE and subsequent Western blotting, eye balls were dissected parallel to the limbus corneae and vitreous was removed. Retinae were carefully excised from the posterior eyecups, immediately stabilized with protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany), and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further processing. Before application on 1D gels, specimens were homogenized, lyophilized, and dissolved in lysis buffer (9 M urea, 2 M thiourea, 65 mM DTT, and 4% CHAPS). Protein content was determined using the Bradford assay (Sigma, Deisenhofen, Germany).

For immunohistochemistry, posterior eyecups were immersion fixed with Bouin's solution (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), dehydrated in a series of alcohols, and sliced into preassigned fragments as described before (Ehrenhofer et al., 2002). Resulting tissue blocks were embedded in paraffin, sectioned (8  $\mu\text{m}$ ), and mounted on coated slides (Superforst, Thermo Scientific, Bonn, Germany).

#### Antibodies

Monoclonal mouse anti-vimentin antibody (Clone V9; dilution 1:400) from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany) was used in Western blots (dilution 1:1,000) and immunohistochemistry (dilution 1:400). Mouse monoclonal antibody against GS (Clone 6) from BD Biosciences (Heidelberg, Germany) was used in immunohistochemistry at a dilution of 1:1,500.

Goat polyclonal anti-Kir4.1 antiserum (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) was used in Western blots at a dilution of 1:200 and at 1:25 in immunohistochemistry. Rabbit polyclonal anti-Kir2.1 antiserum was obtained from Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel) and was used in a dilution of 1:1,000 in Western blots and 1:100 in immunohistochemistry. Monoclonal mouse anti-AQP4 antibody (Santa Cruz) was used at a working dilution of 1:50 for candidate detection in tissue sections. Rabbit polyclonal antibody specific for AQP5 was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and used at 1:100 for immunohistochemistry.

Alexa Fluor-labeled secondary IgG antibodies were obtained from Invitrogen (Karlsruhe, Germany) and all used at a working dilution of 1:500 (we used goat anti-mouse IgG coupled to alexa488 or alexa546, goat anti-rabbit IgG alexa647, and donkey anti-goat IgG alexa546). For conventional stainings, both secondary

horse anti-mouse IgG biotin and goat anti-rabbit IgG biotin from Linaris (Wertheim, Germany) were used at a concentration of 1:200.

Secondary antibodies used in Western blotting experiments were HRP-coupled horse anti-goat IgG (Linaris, Wertheim, Germany; 1:10,000), goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich; 1:5,000) and goat anti-rabbit IgG (Serotec, Düsseldorf, Germany; 1:10,000).

### Quantification of Candidates Using SDS-PAGE and Western Blotting

Equal total protein amounts from retinal lysates were separated by SDS-PAGE (12% gels) and blotted semidry on PVDF membranes (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Unspecific binding was blocked with either 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) or 5% nonfat dry milk for 1 h at room temperature. Blots were incubated with primary antibody (anti-vimentin, anti-Kir4.1, or anti-Kir2.1) at 4°C overnight and then washed three times in PBS-T. Binding was detected by HRP-coupled secondary antibody incubation for 1 h at room temperature. After six further washing steps in PBS-T, signals were detected by enhanced chemoluminescence on X-ray films (Fuji; Christiansen, Planegg, Germany).

Films were scanned on a transmission scanner, and quantification of Western blot signals by densitometry was performed using ImageQuant<sup>TL</sup> software (GE Healthcare). Vimentin, Kir4.1, and Kir2.1 abundances between ERU cases and controls were statistically analyzed using the Mann–Whitney test. The differences in protein expression were considered significant if the *P* value was  $\leq 0.05$ .

### Immunohistochemistry of Target Tissue

Heat antigen retrieval was performed at 99°C for 15 min in 0.1 M EDTA–NaOH buffer (pH 8.8). To prevent unspecific antibody binding, sections were blocked with 1% BSA in TBS-T + appropriate serum for 40 min at RT before every primary antibody incubation. Blocking serum was chosen according to the species the secondary antibody was produced in. Histopathologic changes within diseased retinas were evaluated in comparison to controls on sections stained with H&E.

For single stainings, AQP4 and AQP5 signals were detected with biotin-labeled secondary antibodies, followed by peroxidase-conjugated streptavidin (Vectastain ABCElite:HRP kit; Linaris). Binding was visualized by developing with the Vector HRP substrate kit VIP, which results in violet color (Linaris). Exactly the same development time was abided by each single section.

Multiple labeling was performed consecutively, with blocking steps (ProteinBlock; Dako, Hamburg, Germany) between single antibody incubations. For fluorescence triple labeling, sections were incubated with primary antibodies (Kir2.1, Kir4.1, AQP4, and AQP5 at 4°C overnight; vimentin and GS for 3 h at RT) followed by re-

spective secondary antibodies (30 min at RT). Cell nuclei were counterstained with DAPI (Invitrogen, Karlsruhe, Germany; 1:1,000). Finally, the sections were mounted with glass coverslips using Dako fluorescent mounting medium (Dako). Fluorescent images were recorded with Axio Imager M1 or Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany) and the Axio Vision 4.6 software (Zeiss).

Negative controls for all immunohistochemical experiments included omission of the primary antibody as well as incubation with isotype-matched primary antibody of irrelevant specificity.

### Image Analysis of VIP-Stained Retina Sections

All VIP-stained sections were scanned at 20× objective magnification by a Mirax Scanner (Zeiss). For each of the resulting digital slides, subsets (regions of interest) were defined from areas of retina from the median to central areas (Ehrenhofer et al., 2002) and analyzed with Definiens Enterprise Image Intelligence Suite software (Definiens, München, Germany) (Batz et al., 2006, 2009). A rule set was developed to detect and quantify semantic classes. In a first step, the algorithm segments pictures iteratively, recognizing groups of pixels as objects. Further, the objects are classified based on staining intensity, morphology, neighborhood, and special color features and graded into VIP area and background area. Staining intensity within detected VIP areas was determined. Using the weighted mean of staining intensity, quantitative expression of AQP4 and AQP5 was calculated in the target tissue. A total of 12 healthy and 14 diseased retinas were comprised in the statistical analysis. Mann–Whitney test was performed for comparison of protein expression in healthy and ERU retinas, and values were regarded as significant if the *P* value was  $\leq 0.05$ .

## RESULTS

### Proteomic Changes of Inwardly Rectifying Potassium Channels and Aquaporins in Uveitic Retina

In a previously quantitative label-free LC-MSMS analysis, comparing membrane protein-enriched fractions of a healthy retina to a ERU-diseased case, a dataset containing differentially regulated proteins was generated (Hauck et al., 2010). Besides other interesting candidates, a group of Müller cell-specific proteins was discovered, supporting the assumption that changes in these Müller cell membrane proteins point to an important role in uveitis pathogenesis. Two of these proteins, inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 and water channel AQP4 participate in K<sup>+</sup> and water homeostasis. Kir4.1 was identified with one peptide and a downregulation of almost 10-fold at ERU retinal membrane fractions when compared with controls, whereas AQP4, identified with three peptides, was 2.4-fold upregulated in uveitic state (Table 1). These findings suggest the functional affection of Müller glial cells in uveitis besides the previously

TABLE 1. Differential Expression of Müller Cell-Related Retinal Membrane Proteins in ERU

Protein name <sup>a</sup>	Accession no. <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Peptide count <sup>d</sup>	Confidence score <sup>e</sup>	Anova (P) <sup>*,f</sup>	Healthy/ERU <sup>g</sup>	Change in ERU <sup>h</sup>
Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1	ENSECAP00000003208	KCNJ10	1	35	0.005	9.59	▼
Aquaporin 4	ENSECAP00000003378	AQP4	3	163	0.001	0.41	▲
Aquaporin 5	ENSECAP00000006464	AQP5	3	137	0.002	2.20	▼

<sup>a</sup>Protein name.  
<sup>b</sup>Accession number as listed on Ensembl database (<http://www.ensembl.org/index.html>).  
<sup>c</sup>Gene name.  
<sup>d</sup>Number of peptides the protein was identified with.  
<sup>e</sup>Confidence score as given in Mascot, scores were considered significant if the value was higher than 30 (\* $P \leq 0.01$ ).  
<sup>f</sup>Significance of differential expression of proteins in healthy cases compared with control (\* $P \leq 0.05$ ).  
<sup>g</sup>Regulation factor.  
<sup>h</sup>Expression level of proteins in ERU indicated by arrow (▲, upregulated in ERU; ▼, downregulated in ERU).

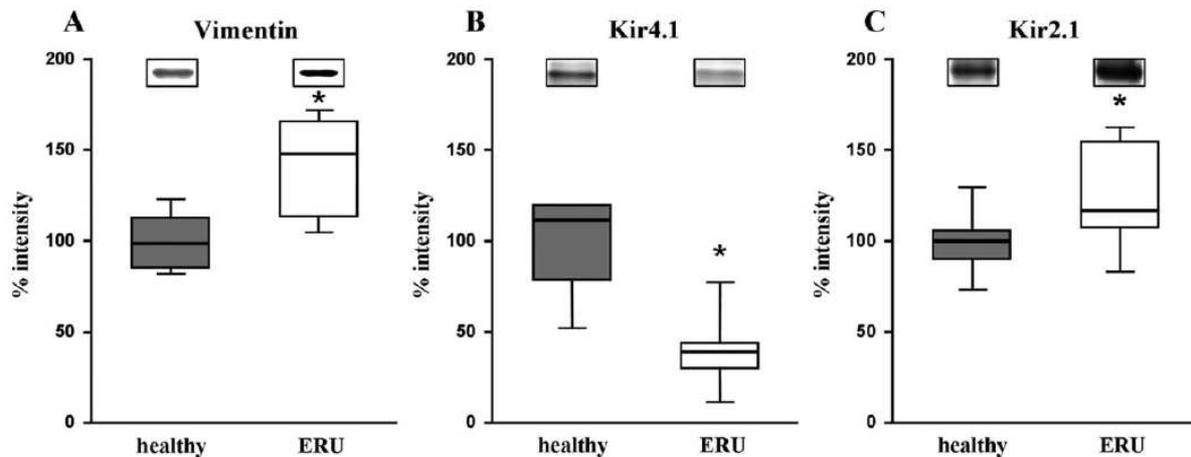


Fig. 1. Western blot quantification of candidates in healthy and uveitic retina samples. Western blot signals for vimentin (A), Kir4.1 (B), and Kir2.1 (C) of control (gray boxes, representative band above) and uveitic samples (white boxes, representative band above) were quantified by densitometry, and statistical significance was calculated using the Mann–Whitney test. Data are represented in a box plot, and median is marked by a black line in boxes. Quantification of vimentin expression (A) results in a significant (\* $P \leq 0.05$ ) upregulation in

uveitic retinas ( $n = 4$ ) compared with control samples ( $n = 4$ ) with the median values of 98.5% (healthy) and 148% (diseased). Kir4.1 (B) shows a significantly (\* $P \leq 0.05$ ) decreased expression level in uveitic retinas ( $n = 4$ ) compared with controls ( $n = 5$ ). Median value of healthy retinas was 113.5% in contrast to 37% of uveitic samples. Expression level of Kir2.1 (C) significantly (\* $P \leq 0.05$ ) increases in diseased ( $n = 10$ ) compared with healthy retinas ( $n = 12$ ) with a difference in the median values of 19.5%.

described morphological alterations demonstrated by GFAP and vimentin upregulation (Deeg et al., 2006; Hauck et al., 2007). Interestingly, another protein of the aquaporin family, AQP5, was detected and attracted our interest as this protein has not yet been described in the horse retina. AQP5 was identified with three peptides and appeared at a lower expression level in uveitis compared with controls (Table 1).

**Retinal K<sup>+</sup> Homeostasis-Related Proteins: Changed Expression Patterns and Levels Emphasize the Occurrence of Gliosis in Autoimmune Uveitis**

Gliosis is a general Müller cell response to retinal diseases (Bringmann et al., 2006). In autoimmune uveitis, gliosis is indicated by a characteristic upregulation of GFAP and vimentin as well as a downregulation of GS (Deeg et al., 2006; Hauck et al., 2007); however, for vimentin, this upregulation has not been quantified. In

this study, we confirm a significant (\* $P \leq 0.05$ ) 1.5-fold upregulation of vimentin in uveitis by quantification of Western blot signal intensities (Fig. 1A).

As a consequence of gliosis, Müller cells reduce the K<sup>+</sup> conductance of their membranes, particularly the currents mediated by Kir4.1, resulting in a depolarized membrane potential (Bringmann et al., 2000). Kir channel currents were already described to be reduced in various retinopathies associated with gliotic alterations, causing a severe loss of Müller cell function, because of a loss of the hyperpolarized membrane potential (Bringmann et al., 2006). To reinforce our initial findings in a higher number of cases, quantification of Kir4.1 in total retina lysates of controls and ERU horses was performed with Western blots. Signal intensities of Kir4.1 were determined and compared between diseased (Fig. 1B, white box) and healthy (Fig. 1B, gray box) specimens. Signal intensity of diseased cases (median 37%) was significantly (\* $P \leq 0.05$ ) decreased compared with that of controls (median 113.5%) (Fig. 1B). As this result indicated an impaired K<sup>+</sup> ion and water homeostasis,

we were interested whether Kir2.1, another Müller cell channel participating in  $K^+$  siphoning (Kofuji et al., 2002), was affected by the inflammatory process in the uveitic retina. Although the weakly rectifying potassium channel Kir4.1 mediates bidirectional fluxes, the strongly rectifying potassium channel Kir2.1 mediates only inwardly potassium fluxes (Kubo et al., 1993; Takumi et al., 1995). Quantification of Kir2.1 expression in ERU retinas revealed a significant 19.5% higher median value than in healthy retinas (Fig. 1C). As Kir channels were already described to be enriched in certain Müller cell membrane domains (Kofuji et al., 2000, 2002; Nagelhus et al., 1999), we were next interested to determine the Kir channel distributions in the healthy avascular equine retina as well as in uveitic state. To this end, we performed immunohistochemical triple labeling of healthy (Fig. 2, left panel) and diseased (Fig. 2, right panel) retinal sections. Differential interference contrast (DIC) image of a representative healthy retina (A) compared with uveitic retina (Fig. 2B) revealed a destruction of retinal tissue with loss of photoreceptor outer segments in uveitic eyes (Fig. 2B, arrows). In the healthy retina, vimentin (Fig. 2C) was expressed throughout the Müller cells, whereas in uveitic retina (Fig. 2D), vimentin upregulation indicated Müller cell gliosis. As expected, Kir4.1 almost disappeared in ERU condition (Fig. 2F) compared with controls (Fig. 2E), where it presented with an evenly distributed immunoreactivity along the entire Müller cells from the inner to the outer limiting membrane. Immunostaining of Kir2.1 in healthy tissues (Fig. 2G) revealed a localization in Müller cell endfeet and along the Müller cell trunks in a punctate pattern. Further, Kir2.1 signal was detected in the inner nuclear layer and outer limiting membrane (Fig. 2G). In contrast to this distribution, Kir2.1 immunoreactivity in uveitic retinas was consistently found associated to cell nuclei primarily in the inner nuclear layer, where Müller cell somata are located, and in the outer nuclear layer (Fig. 2H). Overlay image of healthy retina confirms Müller cell association of Kir4.1 and Kir2.1 in the equine retina displayed by coexpression with vimentin (Fig. 2I). In contrast, gliotic Müller cells in uveitic tissues displayed a shattered morphology with absent expression of Kir4.1 but apparent immunoreactivity for Kir2.1 in the outer nuclear layer (Fig. 2J). These Kir2.1-positive structures do also show immunoreactivity for vimentin (Fig. 2J, arrows mark overlay of vimentin and Kir2.1 that is displayed in yellow).

#### Expression of AQP4 in Uveitis Increases and Expression Pattern Changes Profoundly

Aquaporins constitute a large family of proteins that play a critical role in water movements (Agre et al., 1995). Aquaporin 4 allows bidirectional transport of water and was described to work in concert with Kir4.1 reflected by their coexpression in specific Müller cell membranes (Nagelhus et al., 1999). As antibodies against AQP4 were not suitable for Western blot

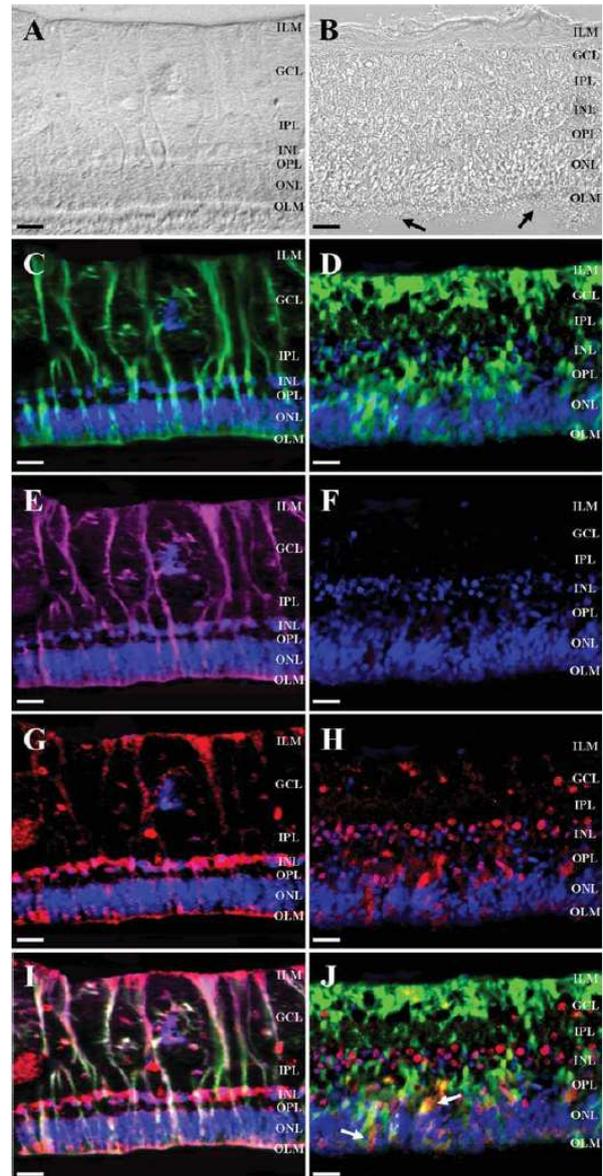


Fig. 2. Retinal expression of potassium channels Kir4.1 (magenta) and Kir2.1 (red) in comparison to the Müller cell marker vimentin (green) in a representative healthy (left panel) and ERU-diseased retina (right panel). Differential interference contrast (DIC) image of a representative healthy retina (A) and a retina affected by ERU (B), displaying a loss of photoreceptor outer segments (marked with arrows) and tissue destruction. Müller cells of control section show a distinct immunoreactivity for vimentin throughout the retina (C). In ERU-diseased retina, gliotic Müller cells that are highly vimentin positive display a severely changed morphology (D). Kir4.1 immunoreactivity along the entire Müller cell of healthy retina (E) almost disappears in ERU-diseased retina (F). Kir2.1 is expressed along the Müller cell trunk, including staining of endfeet membranes, punctuate expression in trunks, positive elements of the INL and ONL, and staining of the OLM (G). In uveitic retinas, this expression changes to cell somata of the inner nuclear layer and some elements of the ONL (H). Overlay image of healthy retina (I) shows considerable colocalization of vimentin, Kir4.1, and Kir2.1 within the Müller cell (triple staining in white color). Whereas in diseased retina (J), no colocalization of all three proteins is detectable, arrows mark colocalization of vimentin and Kir2.1 (yellow) in elements of the ONL. ILM, inner limiting membrane; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OLM, outer limiting membrane. Scale bars, 20  $\mu$ m.

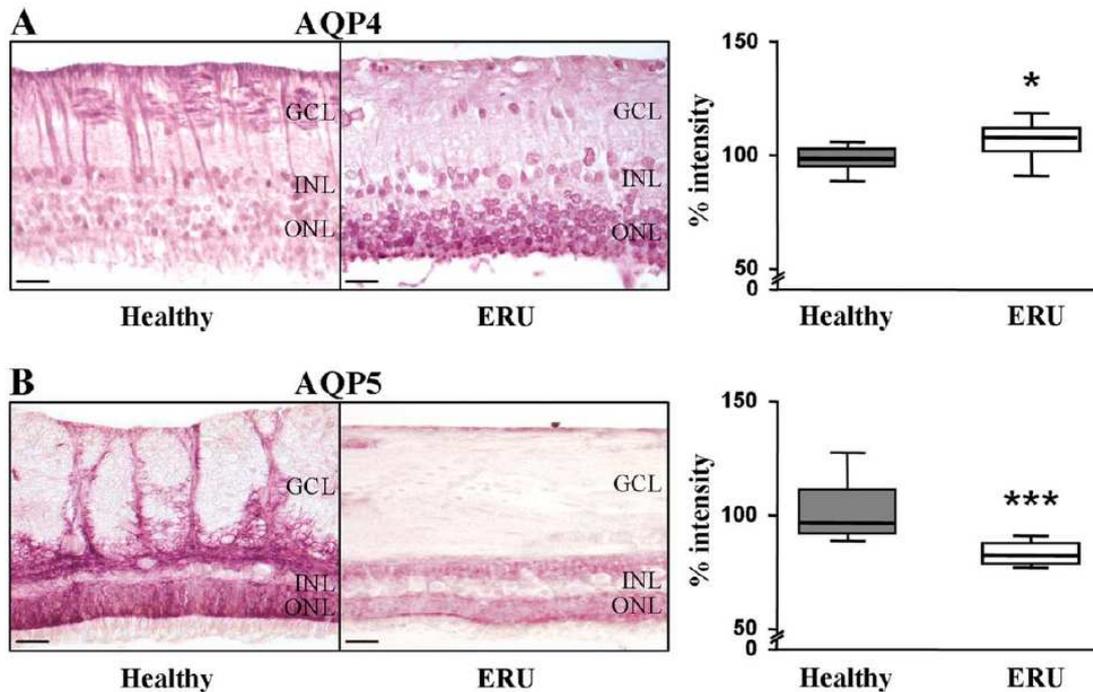


Fig. 3. Image analysis of immunohistochemistry stainings. Quantification of AQP4 and AQP5 was performed on VIP stainings of healthy ( $n = 12$ ) and diseased ( $n = 14$ ) retinal sections. Sections were graded into VIP area and background area, and staining intensity was determined in VIP areas. Quantitative expression was calculated using the weighted mean, and values were compared between healthy (gray boxes) and diseased (white boxes) retina sections. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test. Results are represented in a box plot with the median value marked as a black line in boxes. Images display representative stainings (healthy, left image; ERU,

right image). (A) AQP4 shows displaced immunoreactivity from Müller cell trunks in healthy section to outer nuclear layer in diseased retinal sections. Expression level in diseased cases is significantly ( $*P < 0.05$ ) increased compared with healthy (median healthy 99.5%; ERU 109%). (B) AQP5 is detectable in equine retina and shows a Müller cell-like shape in healthy retina sections. In ERU-diseased retinas, the immunoreactivity is significantly ( $***P < 0.001$ ) decreased at a similar expression pattern (median ERU 81%; healthy 93.5%). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ .

analyses, we chose a different approach to reassess the result from our initial experiments. Control and diseased retinas were immunostained against AQP4, and signal was developed in violet color (Fig. 3A). We could gain a first insight in its expression pattern as this method enabled us to study the immunoreactivity of AQP4 in avascular equine retinas and whether it changes in uveitic state. In healthy horse retinas (Fig. 3A, left image), anti-AQP4 antibodies stain the whole Müller cells, which spread the entire thickness of the retina. In contrast, retinal sections of ERU-diseased horses yielded strong expression of AQP4 in inner and outer nuclear layers exclusively (Fig. 3A, right image).

Weighted means of staining intensity were determined in diseased sections (Fig. 3A, white box) and evaluated in comparison to controls (Fig. 3A, gray box) to quantify the AQP4 expression. Image analysis resulted in a significant ( $*P \leq 0.05$ ) elevation in uveitic tissue sections compared with controls. Median of ERU cases was 109.5% in contrast to that of controls at 99.5%. Additionally, the *in situ* localization of the staining signal indicated a profound redistribution of AQP4 from the Müller cells to the INL and ONL. As AQP4 is the main water transport channel in the retina, this suggests an extensive change of physiological processes involved in water homeostasis during uveitis.

#### AQP5 Shows a Müller Cell Characteristic Distribution *In Situ* and Expression Decreases in Uveitis

Although AQP4 was described to be the predominant water channel in the retina (Nagelhus et al., 1998), descriptions about expression of aquaporin 5 in the retina are inconsistent. Although AQP5 mRNA was detected in rat and human retina (Tenckhoff et al., 2005), another study failed to detect AQP5 in rat retina (Patil et al., 1997). We thus considered the elucidation of the cellular and subcellular distribution of AQP5 on the protein level and its relation to molecules involved in fluid regulation of particular importance. As we were interested in assessing the physiological AQP5 expression pattern as well as its disease-associated changes, we performed antibody-based staining of healthy and uveitic retinal sections in combination with quantitative image analysis. The expression pattern of AQP5 in healthy avascular retinas presented with a characteristic Müller cell shape (Fig. 3B, left image). In retina sections of diseased cases, a similar distribution, however, with reduced staining intensity was observed (Fig. 3B, right image). Comparison of staining intensities confirmed highly significant ( $***P \leq 0.001$ ) reduction in diseased cases (Fig. 3B, white box) compared with controls (Fig. 3B, gray box). Median of ERU was 81%

in contrast to that of healthy at 93.5% (Fig. 3B). As aquaporins are all known to be responsible for water permeability across biological membranes, the distribution of AQP5 in retinal tissue and the reduced expression in ERU introduces an additional player in retinal water homeostasis.

### AQP4 and AQP5 Are Both Expressed in Equine Müller Cells

The single stainings of AQP4 and AQP5 gave a first idea about their distribution within the retina. As a next step toward unraveling the relationship between

the two water channels, we performed immunohistochemical triple labeling to determine the expression patterns of aquaporins 4 and 5 in connection with the Müller cell marker GS. Staining of control sections with H&E shows the characteristic layering of the equine retina (Fig. 4A) that comprises a broad ganglion cell layer and a very thin inner plexiform layer (IPL) (Ehrenhofer et al., 2002). Staining of GS labels Müller cells throughout the entire thickness of the retina (Fig. 4C). Although the thicker trunks that pass toward the inner limiting membrane are strongly stained, the trunks that traverse the nuclear layers showed a weaker immunoreactivity. AQP4 was displayed in a characteristic Müller cell shape (Fig. 4E) and colocalized with GS along the whole length of the main trunks that span the retina longitudinal between the inner and outer limiting membranes (Fig. 4I). Furthermore, AQP5 immunoreactivity was visible at a considerable level throughout the retina with enrichments in the IPL and the outer nuclear layer in a honeycomb-like structure (Fig. 4G). In the overlay image of healthy retina, colocalization of AQP5 and GS was detected (Fig. 4I). Especially, the Müller cell processes that traverse the IPL displayed staining of both, AQP5 and GS (Fig. 4I, arrows). As photoreceptor cell somata showed no AQP5 expression and staining terminated at outer limiting membrane, the honeycomb meshwork in the outer nuclear layer might display Müller cells enveloping photoreceptor cells (Fig. 4G). The overlay image confirms an association of AQP5 and AQP4 to Müller cells but with different patterns of distribution within the cell (Fig. 4I). Although AQP4 is mostly associated to Müller cell main trunks, AQP5 is enriched in processes of the IPL and the outer nuclear layer (Fig. 4I).

Representative staining of ERU-affected retina with H&E shows destruction of the retinal architecture with a loss of photoreceptor outer segments (Fig. 4B, arrows). The strong downregulation of GS (Fig. 4D) in the uveitic state compared with the healthy retina is a well-known

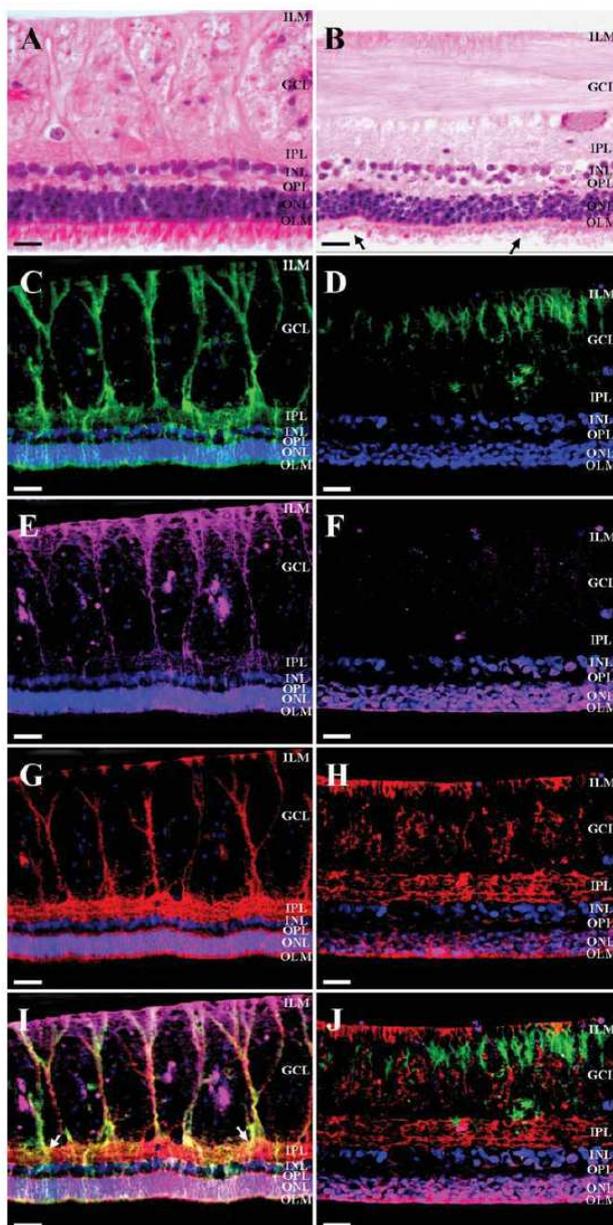


Fig. 4. Triple labeling of glutamine synthetase (GS, green), AQP4 (magenta), and AQP5 (red) in retinal sections from healthy (left panel) and ERU cases (right panel). Healthy retina section stained with H&E (A) shows characteristic architecture compared with uveitic retina (B) where a loss of photoreceptor outer segments is observed (arrows). Immunofluorescence of GS in the healthy retina section (C) appears along the entire Müller cell, which spreads throughout the retina. Gliotic Müller cells of diseased retina show almost no GS immunoreactivity (D). Staining of AQP4 in control section shows distinct labeling along the Müller cell trunks (E) in contrast to ERU-diseased retina (F), where immunoreactivity almost disappeared from the Müller cell trunks but is strongly detectable in the outer nuclear layer and rarely in the inner nuclear layer in a circular shape. AQP5 expression in the healthy retina (G) is distributed along the Müller cell, with enrichments in the inner plexiform layer and in a honeycomb-like shape in the outer nuclear layer. Retina sections from diseased cases show decreased immunoreactivity for AQP5 (H) that is detectable in inner limiting membrane, inner plexiform layer, and outer nuclear layer. Overlay image of the control section (I) shows colocalization of GS, AQP4, and AQP5 in the Müller cell (white), with AQP4 mostly associated to Müller cell trunks and AQP5 to processes of the IPL and ONL. Arrows mark colocalization of AQP5 and GS in the IPL (yellow). In diseased retina section (J), no triple labeling is visible. ILM, inner limiting membrane; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OLM, outer limiting membrane. Scale bars, 20  $\mu$ m.

feature of gliotic or activated Müller cells (Bringmann et al., 2006). An interesting expression pattern of AQP4 in uveitic retina was discovered, where a strong circular immunoreactivity was predominantly detectable in the outer nuclear layer and rarely in the inner nuclear layer, whereas its expression in Müller cell trunks almost disappeared (Fig. 4F). Immunolabeling of AQP5 in diseased retina sections was visible in Müller cell endfeet touching the inner limiting membrane as well as in the IPL and outer nuclear layer (Fig. 4H). However, compared with control sections, labeling intensity was considerably lower. The overlay images of diseased retina (Fig. 4J) verified the altered expression of AQP4 and AQP5 within the Müller cell compared with healthy section (Fig. 4I).

## DISCUSSION

Upregulation of GFAP was described in every type of retinal gliosis (Bringmann et al., 2006), although physiological alterations of gliotic Müller cells may vary in different diseases. Reactive Müller glial cells are characterized by morphological and functional changes that contribute to neuroprotection on one hand but may have detrimental effects on the tissue on the other hand (Bringmann and Reichenbach, 2001; Bringmann et al., 2006, 2009). Hallmark features for activated Müller cells like upregulation of intermediate filaments GFAP and vimentin and decreased expression of GS have been reported in a spontaneous model of autoimmune uveitis previously (Deeg et al., 2006; Hauck et al., 2007). Here, we confirm a significant upregulation of vimentin in ERU and thus support the assumption of a characteristic Müller cell gliosis occurring in autoimmune uveitis (Fig. 1A).

In a recent study, investigating retinal membrane proteins, several proteins with functions in Müller cells were found to be differentially regulated in the uveitic state (Table 1) (Hauck et al., 2010). In detail, two Müller cell membrane channels that were described to be the predominant players in potassium and water homeostasis within the retina (Nagelhus et al., 1999) appeared at different expression levels. Although potassium channel Kir4.1 was found expressed at a decreased level in disease, AQP4 was upregulated in retinal membrane fraction (Tab. 1). These findings and this study indicate, for the first time, that equine Müller cells respond to recurrent autoimmune uveitis with impaired physiological function besides their already proven gliotic morphology.

In this study, we confirmed the significant downregulation of Kir4.1 in all investigated autoimmune uveitis cases compared with controls (Figs. 1B and 2F). A similar alteration in Kir4.1 expression was shown in a number of species with different retinal diseases including ischemic mouse and rat retinas, rats with endotoxin-induced uveitis, and retinal detachment in pigs (Hirrlinger et al., 2010; Iandiev et al., 2006a,b; Liu et al., 2007). Kir4.1 channels are particularly important for Müller cell function as a special property of these cells is the high  $K^+$  conductance of their plasma membranes,

maintained by potassium currents through Kir channels (Newman, 1987). This is accompanied by a very negative resting membrane potential, which is required for most Müller cell functions. The significantly decreased expression level of Kir4.1 in autoimmune uveitic retinas (Fig. 1B) might lead to a reduced  $K^+$  conductance, resulting in a depolarized membrane potential at which Müller cell functionality should be affected.

Investigation of the distribution of Kir4.1 in equine avascular retinas revealed an interesting expression pattern. Although we found that Kir4.1 was evenly distributed along the entire Müller cells (Fig. 2E), its expression in other species was described to be strongly enriched in certain membrane domains facing the vitreous body and blood vessels and at the outer limiting membrane (Ishii et al., 1997; Nagelhus et al., 1999). These membrane domains face the major sinks into which Müller cells release potassium (blood stream and vitreous body), a mechanism that was termed  $K^+$  siphoning (Newman, 1985; Reichenbach et al., 1992). Thus, we consider the evenly distributed expression of Kir4.1 in the healthy mature Müller cells of particular relevance, especially the fact that no distinct enrichments in the endfeet membranes were visible. This may suggest a different mechanism for potassium buffering in the equine avascular retina when compared with other species. For equine retinas, one possibility for  $K^+$  transfer could, therefore, be the initially described  $K^+$  spatial buffering, a mechanism in which functionally coupled glial cells form a network that transfers  $K^+$  ions from regions of elevated  $[K^+]_o$  into directions of lower  $[K^+]_o$  within the central nervous system (Orkand et al., 1966).

To further evaluate the mechanism of  $K^+$  homeostasis in the horse retina, we investigated the strong rectifying potassium channel Kir2.1 that was described to cooperate with Kir4.1 (Kofuji et al., 2002). We found that Kir2.1 was expressed in all Müller cell compartments from endfeet to the outer limiting membrane (Fig. 2G), a distribution similar to the distribution described in rodents (Iandiev et al., 2006a; Kofuji et al., 2002). In comparison to Kir4.1, Kir2.1 expression appeared less intense in the Müller cell trunk but stronger in secondary processes in the inner nuclear layer (Fig. 2I). This could enable cooperation of the two Kir channels, where Kir2.1 mediates inward currents from locations of elevated  $K^+$  concentration and Kir4.1 mainly outward currents toward locations of lower concentrations as previously described in mouse retina where Kir2.1 was predominantly expressed in membrane domains, which have contact to neurons and mediate  $K^+$  influx, and Kir4.1 that was found in membranes through which  $K^+$  ions flow out of the Müller cell (Kofuji et al., 2002).

Interestingly, we found a significantly increased expression level of Kir2.1 in the uveitic state when compared with controls (Fig. 1C). In contrast, an investigation on ischemic rat retinas revealed an unaltered expression level of Kir2.1 in postischemic retinas compared with controls (Iandiev et al., 2006a), and even a decrease of Kir2.1 in a rabbit model of proliferative vitreoretinopathy was described (Ulbricht et al., 2008).

The expression pattern in autoimmune uveitis cases (Fig. 2H) compared with controls (Fig. 2G) changed to a distinct staining of cell somata in the inner nuclear layer and structures in the outer nuclear layer. The appearance of Kir2.1 in cell somata in close proximity of the nuclei of the inner nuclear layer observed in ERU is a novel finding that has not been described so far.

Changes in both potassium channels indicate that potassium buffering and thus Müller cell physiology is highly affected in autoimmune uveitis. Kir2.1 channels predominantly mediate inward currents and are activated only at a very negative membrane potential (Kubo et al., 1993; Yang et al., 2000). We assume that Müller cells might not be able to maintain their hyperpolarized resting potential in uveitis because of the strong downregulation of Kir4.1. This may implicate an inactive state of Kir2.1 in uveitis that merits further investigations with respect to its upregulation in uveitis, which might indicate a compensatory effort to reestablish physiological  $K^+$  fluxes.

Potassium homeostasis within the retina was suggested to be coupled to water transport as a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 was detected in specific Müller cell membrane domains (Nagelhus et al., 1999). In our initial study (Hauck et al., 2010), AQP4 was found to be upregulated in retinal membrane-enriched fractions of an uveitic retina (Tab. 1). In this study, we could now demonstrate a significant alteration of the water homeostasis system within the autoimmune uveitic retina, affecting all ERU cases tested, irrespective of stage or disease (Fig. 3A). Although we found a significant upregulation of AQP4 in autoimmune uveitis, a study on endotoxin-induced uveitis in rats demonstrated a decline in AQP4 expression 1 day after intravitreal LPS injection that then increased to basal level within 14 days (Liu et al., 2007).

In the healthy equine retina, AQP4 was expressed throughout the Müller cells (Figs. 3A and 4E), whereas in the gliotic Müller cells of ERU retinas, AQP4 expression is lost in Müller cell trunks. Instead, a strongly increased AQP4 immunoreactivity was found around cell nuclei in the outer nuclear layer in ERU (Figs. 3A and 4F). This is in line with a previous study on light-injured murine retinas, where increased expression of AQP4 in the outer nuclear layer around photoreceptor nuclei was shown after 3, 10, and 44 days of treatment as a response to the local edema (Iandiev et al., 2008). As AQP4 was described as the main water channel in the retina responsible for water movement across Müller cell membranes (Nagelhus et al., 1998), displaced expression of AQP4 is an interesting finding. It may suggest a demand of water removal from the outer retina and simultaneously point to a deficient water regulation in the inner retina. Another interesting aspect of the prominent AQP4 relocalization during uveitis derives from its role in cell migration. It was demonstrated in wound healing assays with astrocytes from aquaporin-4-null mice that AQP4 facilitates cell migration (Saadoun et al., 2005). AQP4 was confined to the leading edge of glial cells, where they form protrusions to increase plasma membrane permeability and thus are

able to create a hypoosmolar environment the cells move toward (Saadoun et al., 2005). *In vivo* studies demonstrated that migration of brain-implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells toward the site of an injury was greatly impaired compared with astroglial cells from wild-type mice (Auguste et al., 2007). Outgrowth of Müller cell processes into the subretinal space was found in detached cat retinas and was suggested to fill space left by dying photoreceptor cells (Lewis and Fisher, 2000). Hence, we hypothesize that the structures in the inner and outer nuclear layers of the uveitic retina, expressing AQP4 in a circular shape, might be protrusions of gliotic Müller cells migrating toward dying photoreceptors.

Among the 13 known members of the aquaporin family (AQP0–AQP12), AQP4 was so far the only member that was described to be expressed in retinal Müller cells. Nevertheless, several aquaporin mRNAs, including mRNA for AQP5, were detected in rat and human retinas (Tenckhoff et al., 2005). Investigations on the expression of AQP5 in rat ocular tissue using RT-PCR revealed its expression in cornea, lens, iris, and ciliary body, but AQP5 could not be detected in the retina (Patil et al., 1997). Here, we provide evidence that the aquaporin family member AQP5 is expressed in equine retina (Table 1, Figs. 3B and 4G,I) and specify its expression to Müller glial cells. Moreover, we revealed an involvement in a retinal autoimmune disease, as AQP5 was significantly downregulated in all uveitis cases (Fig. 3B). Aquaporins are primarily water selective (Agre et al., 2002) and thus AQP5 might be involved in water transport across the Müller cell membrane. Within the eye, AQP5, besides AQP1, was found to be implicated in corneal fluid transport and transparency (Thiagarajah and Verkman, 2002) and suggested to be involved in generating tears as expression in lacrimal gland was shown (Ishida et al., 1997). However, studies in a mouse model provided evidence against the requirement of AQPs in lacrimal gland function (Moore et al., 2000). Other roles of AQP5 outside of the eye, such as fluid secretion by salivary (Ma et al., 1999) and airway submucosal glands (Song and Verkman, 2001), are all related to water transport. Hence, we assume that AQP5 may also be involved in fluid regulation within the equine retina. Strong expression of AQP5 in Müller cell secondary processes at the levels of the outer nuclear and IPL (Fig. 4G,I) complements the strong immunoreactivity of AQP4 (Fig. 4E,I) in Müller cell trunks and thus may indicate that these two proteins are responsible for water movements in distinct and separated areas.

Furthermore, this study provides the first report of an AQP5 involvement in a retinal disease. We found AQP5 to be expressed at a significant lower level in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis (Figs. 3B and 4H). Investigations on corneas of AQP5<sup>-/-</sup> mice revealed increased corneal thickness and decreased osmotic water permeability compared with wild-type mice, thus suggesting that AQP5 provides water transport across epithelial barriers (Thiagarajah and Verkman, 2002). Considering this finding, we assume

that the decreased expression of AQP5 in autoimmune uveitis (Figs. 3B and 4H) might cause a reduced water permeability of gliotic Müller cells and thus an impaired water regulation within the uveitic retina. AQP5 expression in the lung was found to be downregulated in pulmonary inflammation caused by adenovirus infection in mice (Towne et al., 2000). Furthermore, they showed that AQP5 expression in cultured mouse lung epithelial cells is decreased by treatment with the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  (Towne et al., 2001). In ERU, an invasion of macrophages into ocular tissue after blood-retinal barrier breakdown was described (Zipplies et al., 2010). As macrophages secrete the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$ , this could be a link to reduced expression of AQP5 in autoimmune uveitis. This first description of AQP5 in the retina and in retinal disease, particularly its involvement and interaction with other Müller cell membrane channels, merits further investigation.

## REFERENCES

- Agre P, Brown D, Nielsen S. 1995. Aquaporin water channels: Unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* 7:472–483.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. 2002. Aquaporin water channels—From atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542(Part 1):3–16.
- Auguste KI, Jin S, Uchida K, Yan D, Manley GT, Papadopoulos MC, Verkman AS. 2007. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J* 21:108–116.
- Baatz M, Arini N, Schape A, Binnig G, Linssen B. 2006. Object-oriented image analysis for high content screening: Detailed quantification of cells and sub cellular structures with the Cellenger software. *Cytometry A* 69:652–658.
- Baatz M, Zimmermann J, Blackmore CG. 2009. Automated analysis and detailed quantification of biomedical images using Definiens Cognition Network Technology. *Comb Chem High Throughput Screen* 12:908–916.
- Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Kodahl H, Faude F, Reichelt W, Reichenbach A. 2000. Role of glial K<sup>+</sup> channels in ontogeny and gliosis: A hypothesis based upon studies on Müller cells. *Glia* 29:35–44.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. 2009. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 28:423–451.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397–424.
- Bringmann A, Reichenbach A. 2001. Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 6:E72–E92.
- Deeg CA. 2009. A proteomic approach for studying the pathogenesis of spontaneous equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Immunol Immunopathol* 128:132–136.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, Schmalz T, Stangassinger M, Ueffing M. 2008. Equine recurrent uveitis—A spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* 40:151–153.
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thurau SR, Wollanke B, Wildner G. 2001. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:393–398.
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, Goebel TW, Olazabal U, Gerhards H, Reese S, Stangassinger M, Kaspers B, Ueffing M. 2006. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5:1462–1470.
- Deeg CA, Raith AJ, Amann B, Crabb JW, Thurau SR, Hauck SM, Ueffing M, Wildner G, Stangassinger M. 2007. CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* 2007:39245.
- Ehrenhofer MC, Deeg CA, Reese S, Liebich HG, Stangassinger M, Kaspers B. 2002. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol* 5:39–47.
- Forrester JV. 1991. Uveitis: Pathogenesis. *Lancet* 338:1498–1501.
- Hauck SM, Dietter J, Kramer RL, Hofmaier F, Zipplies JK, Amann B, Feuchtinger A, Deeg CA, Ueffing M. 2010. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 9:2292–2305.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Gerhards H, Ueffing M, Deeg CA. 2007. Retinal Müller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 6:2121–2131.
- Hirrlinger PG, Ulbricht E, Iandiev I, Reichenbach A, Pannicke T. 2010. Alterations in protein expression and membrane properties during Müller cell gliosis in a murine model of transient retinal ischemia. *Neurosci Lett* 472:73–78.
- Iandiev I, Tenckhoff S, Pannicke T, Biedermann B, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. 2006a. Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 396:97–101.
- Iandiev I, Ueckermann O, Pannicke T, Wurm A, Tenckhoff S, Pietsch UC, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Uhlmann S. 2006b. Glial cell reactivity in a porcine model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2161–2171.
- Iandiev I, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Grimm C, Reme CE, Reichenbach A, Pannicke T, Bringmann A. 2008. Müller cell response to blue light injury of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3559–3567.
- Ishida N, Hirai SI, Mita S. 1997. Immunolocalization of aquaporin homologs in mouse lacrimal glands. *Biochem Biophys Res Commun* 238:891–895.
- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y. 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, K<sub>IR</sub>2.1/Kir4.1, on mammalian retinal Müller cell membrane: Their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17:7725–7735.
- Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A. 2002. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: Implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39:292–303.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: Phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20:5733–5740.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362:127–133.
- Lewis GP, Fisher SK. 2000. Müller cell outgrowth after retinal detachment: Association with cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1542–1545.
- Liu XQ, Kobayashi H, Jin ZB, Wada A, Nao IN. 2007. Differential expression of Kir4.1 and aquaporin 4 in the retina from endotoxin-induced uveitis rat. *Mol Vis* 13:309–317.
- Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. 1999. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 274:20071–20074.
- Moore M, Ma T, Yang B, Verkman AS. 2000. Tear secretion by lacrimal glands in transgenic mice lacking water channels AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5. *Exp Eye Res* 70:557–562.
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26:47–54.
- Nagelhus EA, Mathiesen TM, Ottersen OP. 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129:905–913.
- Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P, Ottersen OP. 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: Polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18:2506–2519.
- Newman EA. 1985. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* 317:809–811.
- Newman EA. 1987. Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: A comparative study. *J Neurosci* 7:2423–2432.
- Newman EA. 1993. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci* 13:3333–3345.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL. 1984. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K<sup>+</sup> siphoning. *Science* 225:1174–1175.
- Newman EA, Reichenbach A. 1996. The Müller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307–312.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788–806.

- Pannicke T, Uckermann O, Iandiev I, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. 2005. Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Muller glial cells. *J Neuroimmunol* 161:145–154.
- Patil RV, Saito I, Yang X, Wax MB. 1997. Expression of aquaporins in the rat ocular tissue. *Exp Eye Res* 64:203–209.
- Reichenbach A, Henke A, Eberhardt W, Reichelt W, Dettmer D. 1992. K<sup>+</sup> ion regulation in retina. *Can J Physiol Pharmacol* 70(Suppl):S239–S247.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D, Hertz L. 1993. What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *J Chem Neuroanat* 6:201–213.
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Watanabe H, Yan D, Manley GT, Verkman AS. 2005. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* 118(Part 24):5691–5698.
- Schnitzer J. 1988. Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: Their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia* 1:74–89.
- Song Y, Verkman AS. 2001. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands. *J Biol Chem* 276:41288–41292.
- Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S, Kurachi Y. 1995. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem* 270:16339–16346.
- Tenckhoff S, Hollborn M, Kohlen L, Wolf S, Wiedemann P, Bringmann A. 2005. Diversity of aquaporin mRNA expressed by rat and human retinas. *Neuroreport* 16:53–56.
- Thiagarajah JR, Verkman AS. 2002. Aquaporin deletion in mice reduces corneal water permeability and delays restoration of transparency after swelling. *J Biol Chem* 277:19139–19144.
- Towne JE, Harrod KS, Krane CM, Menon AG. 2000. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:34–44.
- Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. 2001. Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J Biol Chem* 276:18657–18664.
- Ulbricht E, Pannicke T, Hollborn M, Raap M, Goczalik I, Iandiev I, Hartig W, Uhlmann S, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A, Francke M. 2008. Proliferative gliosis causes mislocation and inactivation of inwardly rectifying K(+) (Kir) channels in rabbit retinal glial cells. *Exp Eye Res* 86:305–313.
- Yang D, Sun F, Thomas LL, Offord J, MacCallum DK, Dawson DC, Hughes BA, Ernst SA. 2000. Molecular cloning and expression of an inwardly rectifying K(+) channel from bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2936–2944.
- Zipplies JK, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Ueffing M, Deeg CA. 2009. Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 8:992–998.
- Zipplies JK, Kirschfink M, Amann B, Hauck SM, Stangassinger M, Deeg CA. 2010. Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology* 215:949–955.

## 4 PUBLIKATION II

### Titel

“Isolation, characterization and establishment of an equine retinal glial cell line:  
A prerequisite to investigate the physiological function of Müller cells in the retina”

### Autoren

**Christina Eberhardt**, Barbara Amann, Manfred Stangassinger, Stefanie M. Hauck  
und Cornelia A. Deeg

### Journal

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition

J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2011 Apr 30. [Epub ahead of print]

doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01147.x.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0396.2011.01147.x/abstract>

## ORIGINAL ARTICLE

**Isolation, characterization and establishment of an equine retinal glial cell line: a prerequisite to investigate the physiological function of Müller cells in the retina**C. Eberhardt<sup>1</sup>, B. Amann<sup>1</sup>, M. Stangassinger<sup>1</sup>, S. M. Hauck<sup>2</sup> and C. A. Deeg<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Veterinary Sciences, Institute of Animal Physiology, Ludwig-Maximilians University, München, Germany, and<sup>2</sup> Department of Protein Science, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Neuherberg, Germany**Keywords**

physiology, retina, Müller glia, cell line, horse, eqMC

**Correspondence**

C. A. Deeg, Institute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians University, Veterinärstr. 13, 80539 München, Germany. Tel: +49 0 89/2180 1630; Fax: +49 0 89/2180 2554; E-mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

Received: 17 February 2011;  
accepted: 23 March 2011**Summary**

Retinal Müller glial cells are of vital importance for maintaining a physiological environment within the retina. To this end, they provide highly specialized physiological properties to support neurons in structure, nutrition and metabolism. The purpose of this study was to isolate Müller cells from the equine retina, determine their characteristics and subsequently establish a stable equine Müller cell line (eqMC) that will provide a prerequisite for investigations on their physiological properties. Dissociated retinal cells were obtained from equine retinas by a papain digestion technique followed by trituration and a cell attachment method by which pure Müller cell cultures were achieved. Morphological examination was performed using phase-contrast microscopy, and further characterization of different subcultures was accomplished by immunocytochemistry. Cells of passage 1 showed distinct signals for glutamine synthetase and vimentin, whereas glial fibrillary acidic protein expression was almost absent. Characteristic expression patterns remained unaltered in all subcultures. Furthermore, cultured Müller cells stably expressed the microfilament alpha-smooth muscle actin, the proliferation marker Ki67 and the membrane channels Kir4.1 and aquaporin 4. The present study introduces the eqMC-7 that will facilitate studies investigating the physiological role of Müller cells within the equine retina.

**Introduction**

Müller glial cells constitute the only macroglial cells in the equine retina and are of vital importance with respect to maintenance of retinal physiology. Their accurate physiological function is indispensable to ensure neuronal support resulting in a flawless operation of the retinal system (Reichenbach et al., 1993). Their most relevant supporting features comprise neurotransmitter uptake and recycling, maintenance of the metabolic symbiosis and regulation of

the retinal potassium and water homeostasis (Newman and Reichenbach, 1996; Bringmann et al., 2006, 2009b). For the accomplishment of their tasks and to maintain retinal integrity, Müller cells exhibit a characteristic spatial morphology establishing the link between neurons as well as to adjacent compartments (i.e. subretinal space and vitreous body). They span the entire thickness of the retina, with somata located in the inner nuclear layer, processes that envelope neurons and synapses in the plexiform layers, endfeet facing the vitreous and branches that

draw through the outer nuclear layer to terminate at the outer limiting membrane (Newman and Reichenbach, 1996). Moreover, these cells combine a range of special physiological properties to implement their nursing function on which neurons are dependent. These comprise a specialized energy metabolism, which relies mainly upon anaerobic glycolysis and leads to a very limited oxygen consumption (Winkler *et al.*, 2000). In addition, they express the glutamate/aspartate transporter GLAST, through which Müller cells constitute the electrogenic uptake of the neurotransmitter glutamate (Brew and Attwell, 1987; Derouiche and Rauen, 1995; Harada *et al.*, 1998) and evince a high membrane conductance for potassium (Newman, 1985), which causes a very negative resting membrane potential that is necessary for most of their functions (Brand and Hanke, 1996; Bringmann *et al.*, 2006). The latter is a consequence of the high expression levels of special potassium channels, particularly the Kir4.1 channel, which works in concert with the water channel aquaporin 4 (AQP4) (Nagelhus *et al.*, 1999; Kofuji *et al.*, 2000). Within the retina, these membrane channels are exclusively expressed in Müller cell membranes (Ishii *et al.*, 1997; Nagelhus *et al.*, 1999).

The glial cells' morphology and implementation of some of their assignments and thus their physiological features differ especially between species with vascular and those with avascular retinas (Newman, 1987; Dreher *et al.*, 1992; Yu and Cringle, 2001). These differences can be further illustrated by comparison of studies on Müller cell cultures of different species including rat, rabbit, pig and cat as well as studies on the human Müller cell line MIO M1 (Sarthy, 1985; Lewis *et al.*, 1988; Guidry, 1996; McGillem *et al.*, 1998; Limb *et al.*, 2002). Results from a previous study indicated that Müller cells of the avascular equine retina present differences in their physiology in relation to other mammalian Müller cells (Eberhardt *et al.*, 2011). Besides this study, the equine Müller cell physiology has rarely been studied so far. It is now known that these cells trigger the inflammatory process in equine recurrent uveitis (ERU) and hence show physiological and morphological alterations in diseased state (Hauck *et al.*, 2007; Eberhardt *et al.*, 2011). Equine recurrent uveitis, the main cause of blindness in horses worldwide, is a T-cell-mediated autoimmune disease that is characterized by recurring inflammation of the inner eye (Deeg, 2008). Moreover, it serves as a spontaneous model for human autoimmune uveitis (Deeg *et al.*, 2007). Gliotic alteration of the Müller cell in disease is thought to represent an attempt to

protect the affected tissue. However, detrimental effects of gliosis were reported (Bringmann *et al.*, 2009a). This further demonstrates the importance of these cells in the healthy retina as well as in retinal diseases. Nevertheless, a comprehensive understanding of Müller cell physiology and their engagement within the retina (e.g. neuron–glia interaction and participation in blood–retina barrier composition) is important for subsequent investigations on their involvement in retinal diseases. Therefore, as a prerequisite, a Müller cell line is needed. To our knowledge, reports of neither isolated equine Müller cells nor an equine Müller cell line (eqMC) are available at present. Therefore, the purpose of this study was to isolate equine Müller cells and establish the first eqMC enabling further investigations on their physiological properties within the avascular horse retina and the incitements leading to gliotic differentiation as it occurs in ERU.

## Materials and methods

### Collection of equine retina samples

Healthy eyes of 15 horses (30 eyes) were obtained from a local slaughterhouse. Immediate processing of collected samples was assured after enucleation. Eye balls were disinfected in 70% ethanol and rinsed in Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM; Biochrom, Berlin, Germany). After dissection parallel to the limbus corneae and removal of the anterior eyecup, vitreous was removed. Retina was carefully excised from posterior eyecups and transferred to a petri dish filled with 5 ml DMEM.

### Isolation and culture of Müller cells

The retina was carefully cleaned from vitreous residues, and pigment epithelial attachments were excised. Retinal tissue fragments were then transferred into a new petri dish to ensure a pure retina specimen for further processing. First disintegration of tissue was accomplished mechanically using microscissors to cut the retina into small fragments and subsequent vigorous pipetting. For cell isolation, resulting retinal tissue fragments were incubated with papain (Worthington Biochemical Corporation, Troisdorf, Germany) for 30 min at 37 °C. To ensure full activity of papain, the enzyme was incubated in an activation solution containing 1.1 mM EDTA, 0.067 mM mercaptoethanol and 5.5 mM cysteine-HCL for 30 min at 37 °C prior to use. Following incubation of retinal samples, the reaction was stopped by adding DMEM containing 10% foetal calf

serum (FCS; Biochrom). Desoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) was added, and cells were isolated by trituration using a Pasteur pipette. Dissociated cells were collected by centrifugation (800 g, 10 min, RT), resuspended in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin (Biochrom) and seeded into 25-cm<sup>2</sup> flasks (Cell<sup>+</sup>; Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The cells were allowed to attach for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in an incubator. Purification of cell cultures was obtained by repeated vigorous washing and removal of supernatant with non-attached cells (neuroglial cells) as has been described for porcine Müller cells (Hauck *et al.*, 2003). Purity of primary culture was initially assessed by verification of homologous morphology using phase-contrast microscopy. When approaching confluence, cells were de-attached using trypsin/EDTA (Biochrom) and subsequently split to obtain subcultures (passaging). Dissociated cells were cultured using DMEM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin in an incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### Live-cell imaging

Phase-contrast microscopy was performed to track morphological development of primary cell cultures and for further review of subcultures. Images were recorded with the inverted microscope Leica DMIL with a DFC340 FX camera (both Leica, Wetzlar, Germany) at 20-fold magnification.

#### Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, trypsinized cells were seeded onto glass slides, which were placed in culture plates. Cells were cultured in DMEM without FCS supplement for 16 h and were allowed to attach to the glass surface within this time. Slides were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in acetone for 10 min. To prevent unspecific antibody binding, slides were blocked with 1% BSA in PBS-Tween and 5% FCS for 40 min at room temperature (RT). For fluorescence labelling, slides were incubated with the primary antibodies against glutamine synthetase (GS), vimentin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SM), Ki67, Kir4.1 protein and AQP4 at 4 °C overnight followed by respective secondary antibody incubations (30 min at RT). Cell nuclei were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at a dilution of 1:1000. Finally, sections were mounted with glass coverslips

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). Colours (green or magenta) for detected immunoreactivity were subsequently assigned to each staining, using the software to achieve best possible contrasts and colours visible to the human eye. Negative controls for all immunocytochemical experiments were performed by omission of primary antibody.

#### Antibodies

Mouse monoclonal antibody against GS (Clone 6) from BD Biosciences (Heidelberg, Germany) was used at a dilution of 1:1500, and monoclonal mouse anti-vimentin antibody (Clone V9) from Sigma-Aldrich was used at a dilution of 1:400 in immunocytochemical experiments. Polyclonal rabbit anti-GFAP antibody was obtained from Dako and used at a dilution of 1:1000. Mouse monoclonal antibody against  $\alpha$ -SM (Abcam, Cambridge, UK) was applied at a dilution of 1:50. Mouse monoclonal antibody against Ki67 was obtained from Dako and used at a dilution of 1:100. Goat polyclonal anti-Kir4.1 (dilution 1:100) and monoclonal mouse anti-AQP4 antibody (dilution 1:100) were both obtained from Santa Cruz (Heidelberg, Germany). Alexa Fluor-labelled secondary IgG antibodies were obtained from Invitrogen (Karlsruhe, Germany), and all were used at a working dilution of 1:500. We used goat anti-mouse IgG coupled to alexa 488, goat anti-rabbit IgG alexa 488 and donkey anti-goat IgG alexa 488.

#### Nomenclature

Müller cell subcultures were characterized using live-cell imaging and immunocytochemistry. Subcultures that met chosen criteria such as characteristic morphology, proliferation and expression of one characteristic Müller cell marker vimentin or GS were consecutively termed eqMC-1 to 15 (equine Müller cell – number of horse). Each of these cell lines originated from the pooled retinas of two eyes from one horse.

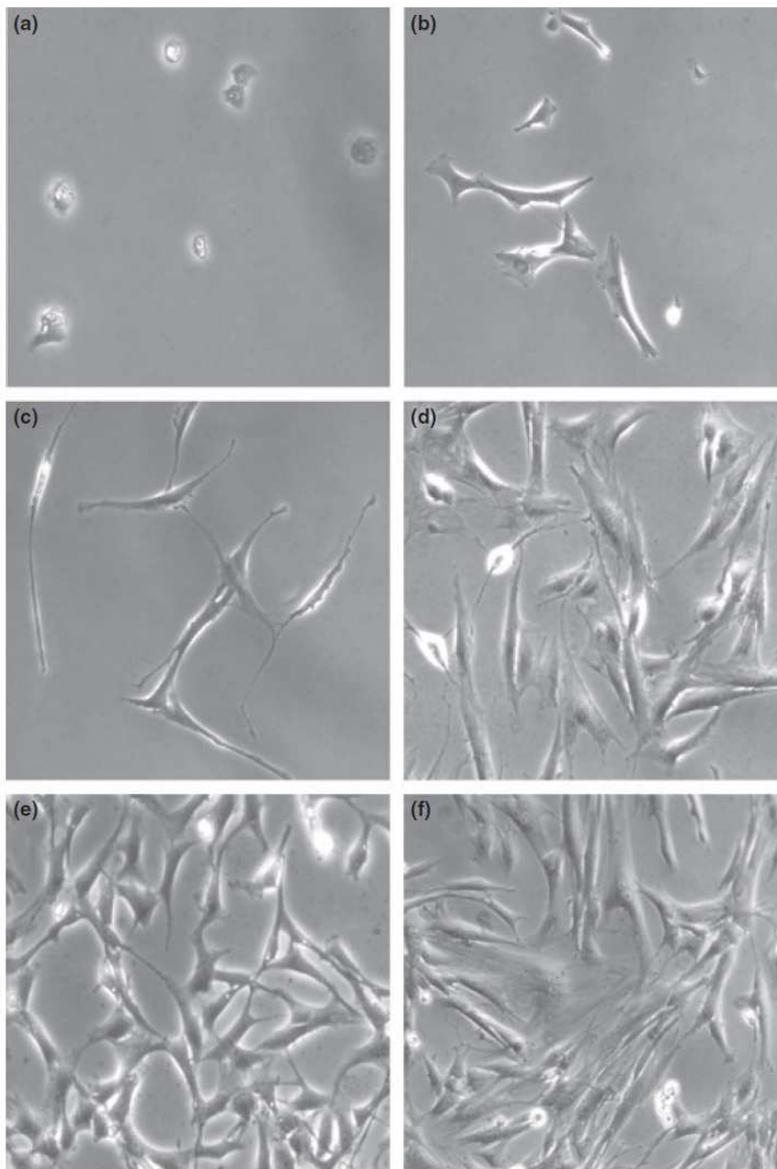
#### Results

Purified cells and subcultures exhibit characteristic Müller glial cell morphology. Primary cultures of dissociated retinal cells appeared heterogeneously after 24 h of incubation. To

characterize cultured cells, we used phase-contrast microscopy to assess morphological features. Besides single cells and debris, non-adherent cells forming cellular clusters could be observed. By gentle panning of the culture flask, some cells were detected to be attached to the culture dish. Subsequent removal of supernatant and vigorous washing of the cultures completely eliminated loosely attached material, leaving single, asymmetrical adherent cells (Fig. 1a). By day 3 of non-confluent cultures, cells started forming bipolar extensions exhibiting a flat and elongated shape (Fig. 1b). Forming of projections

increased within the next 48–72 h of culture resulting in pronounced Müller cell features (Fig. 1c) comprising a characteristic bipolar morphology, cytoplasmic projections and an elongated shape. At this stage, the cells acquired the ability to proliferate. When approaching a confluent monolayer, cells of the primary cultures adopted a fibroblast-like morphology and became increasingly flattened (Fig. 1d).

After 14 days, when reaching confluence, the primary cell cultures were divided into subcultures. Dissociated cells appeared after 3–5 min of incubation with trypsin/EDTA as numerous round-body



**Fig. 1** Phase-contrast images of equine Müller glial cell cultures. (a) Single attached primary cells at day 1 of culture after removal of non-attached material and cells. (b) At day 3 *in vitro*, cells show an elongated morphology with bipolar extensions. (c) Cultured cells at day 5 display the characteristic Müller cell spindle-shape morphology comprising a central nucleus and pronounced projections. (d) Primary Müller cells approaching a confluent monolayer at day 14 of culture. (e) Müller cells of subculture 1 exhibit the same characteristic morphology. (f) Equine Müller cell line-7 at passage 29 displaying a characteristic morphology.

cells accumulating in clusters. When plated, almost all cells of the subcultures were evenly distributed and attached to the substrate within 24 h of culture. All passaged cells exhibited the same bipolar and elongated morphology with several cytoplasmic projections (Fig. 1e). These cells proliferated rapidly, approaching a confluent monolayer in further 2–3 days. Repeated passaging or cultivation following storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  revealed an average generation time of 48 h. At the time of manuscript submission, latest subcultures (passage 29) displayed homogeneous cells resembling the characteristic Müller cell morphology (Fig. 1f).

Expression of Müller cell characteristic markers confirms culture purity and Müller cell origin of eqMC-7 cells

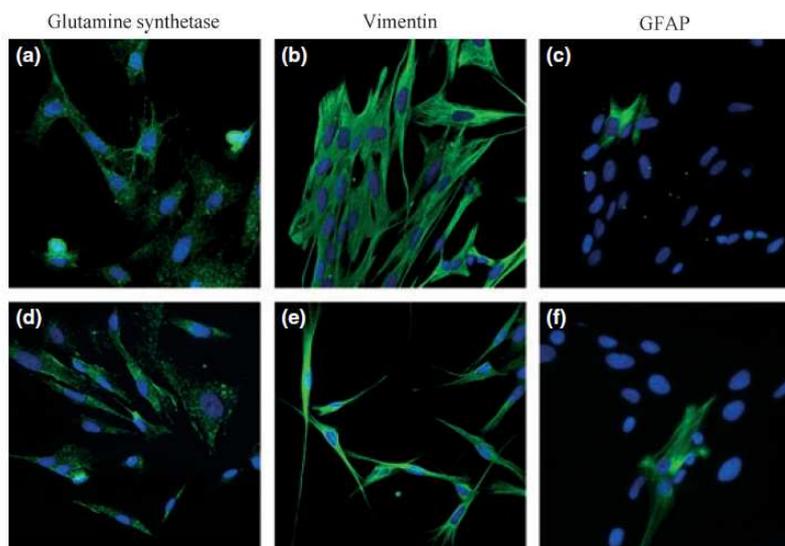
To determine their purity and further characterize cultured cells, we performed immunocytochemistry on cells at passage 1. Cells were seeded onto glass slides and stained for the characteristic Müller cell markers GS or vimentin. GS, an enzyme responsible for the glutamate/glutamine metabolism, was expressed in all tested cells at passage 1. The expression was displayed in a punctuated pattern that appeared predominantly around the central nucleus and less in cell projections (Fig. 2a). Cultured cells also showed strong immunoreactivity for vimentin, an intermediate filament protein of the cytoskeleton (Fig. 2b). The thread-like appearance of vimentin-positive structures traversing the entire cell

confirmed the characteristic Müller cell morphology that was already seen using phase-contrast microscopy (Fig. 1). All of the 15 cultures tested were either positive for vimentin or GS and therefore consecutively termed eqMC-1 to 15. We chose the eqMC-7 for further characterization. To assess whether these cultured Müller cells show an activated phenotype, we determined the expression of the intermediate filament protein GFAP that especially exhibits characteristics of activation (Limb *et al.*, 2002). Glial fibrillary acidic protein was only detected in a small subset of cells (<1%) and mainly in a central circumscribed area within those cells (Fig. 2c). Repeated passaging of cultured eqMC-7 cells revealed no distinct changes in the expression of these characteristic Müller cell proteins. Figure 2(d–f) show representative images of the eqMC-7 stained for GS, vimentin and GFAP. The expression pattern of GS in the cell line appeared similar to that of early cultured cells and was still detectable in all cells (Fig. 2d). The eqMC did also express vimentin in a filamentous shape representing the characteristic elongated morphology (Fig. 2e). The almost complete absence of GFAP in the cell line revealed that no activation occurred during the development from a primary cell culture to the pure eqMC-7 (Fig. 2f).

Proliferating eqMC-7 expresses specific Müller cell membrane proteins and the microfilament  $\alpha$ -SM actin

To further characterize properties of the eqMC, we chose to investigate the expression of four additional

**Fig. 2** Immunocytochemical characterization of Müller cells and the equine Müller cell line-7 (eqMC-7). Upper panel (a–c) shows Müller cells at passage 1. Lower panel (d–f) shows cells of the Müller cell line eqMC-7 after repeated passaging. Müller cells of passage 1 stained positive for glutamine synthetase (green) in a punctuate pattern especially around the central nucleus (a). The same expression pattern was detected in the cell line eqMC-7 (d). Vimentin (green) is highly expressed in a filamentous shape by both, Müller cells at passage 1 (b) and eqMC-7 cells (e). Less than 1% of the Müller cells at passage 1 (c) and the eqMC-7 cells (f) were positive for glial fibrillary acidic protein (green). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue).



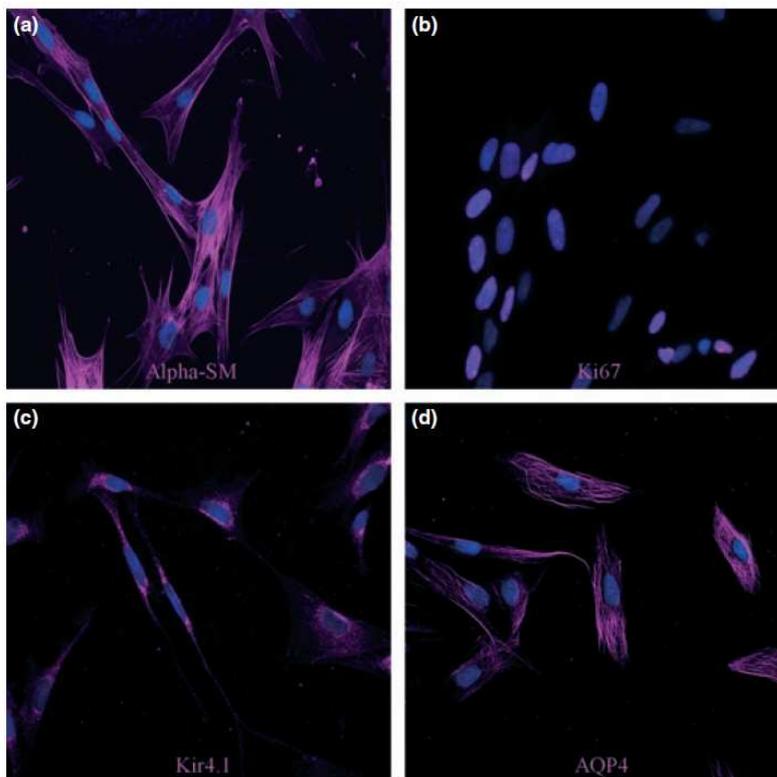
proteins, namely  $\alpha$ -SM, a marker for microfilaments, Ki67, a proliferation marker and the membrane channels Kir4.1 and aquaporin4 (AQP4). Almost all Müller cells of the cell line exhibited  $\alpha$ -SM-positive fibres stretching across the entire cell (Fig. 3a). However, the expression intensities differed between single cells. Most of the DAPI stained nuclei also showed distinct immunoreactivity for the proliferation marker Ki67, which confirms the observation of eqMC-7 maintaining the ability to proliferate (Fig. 3b). Average generation time was determined 48 h in cultured eqMC-7 cells. To assess the maintenance of membrane features, we investigated the expression pattern of two membrane channels that have previously attracted interest in a study on equine Müller cells in healthy retinas and retinas of horses with ERU (Eberhardt *et al.*, 2011). Potassium channel Kir4.1 was expressed by cultured eqMC-7 cells in a circumscriptive area around the central nucleus (Fig. 3c). In some of the cells, this area of grained immunoreactivity extended into the long projections (Fig. 3c). These Müller cells also exhibited positive immunoreactivity for the membrane water channel AQP4 in a meshwork mainly in the area of the cell body (Fig. 3d).

## Discussion

The present report demonstrates the successful isolation and characterization of equine Müller cells and the establishment of the stable eqMC-7, which provides a resource for further investigations on equine Müller cell physiology and subsequent studies to elucidate their participation in retinal diseases such as ERU.

An established method was employed to obtain primary Müller cell cultures. This method was previously used to isolate rat (Hicks and Courtois, 1990), rabbit (Wakakura and Foulds, 1988), porcine (Guidry, 1996) and cat (Lewis *et al.*, 1988) Müller cells as well as Müller cells from a human retina. The latter became spontaneously immortalized and was subsequently characterized as the human glial Müller cell line MIO M1 (Limb *et al.*, 2002). This human cell line has become a highly esteemed implement to study retinal Müller cells (Hollborn *et al.*, 2004; Yong *et al.*, 2010) and was furthermore employed in stem cell research (Lawrence *et al.*, 2007; Bull *et al.*, 2008).

Phase-contrast microscopy showed that the morphology of developing equine Müller cells (Fig. 1a–d)



**Fig. 3** Immunocytochemical stainings of the equine Müller cell line-7 (eqMC-7). (a) Equine Müller cell line-7 cells expressed the cytoskeleton protein alpha-smooth muscle actin (magenta) in a filamentary structure. (b) The proliferation marker Ki67 (magenta) is found positive in almost all nuclei. (c) Potassium channel Kir4.1 (magenta) was expressed in a punctuate pattern mostly in the area around the nucleus. (d) Müller cells expressing the water channel aquaporin 4 (magenta) in their cell body membranes. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue).

resembles that of rabbit (Scherer and Schnitzer, 1989) and guinea pig (Malgorzata Goczalik et al., 2005) Müller cells, which represent those from avascular retinas and also of other mammalian Müller cells from vascular retinas such as pig, rat, cat and human (Sarthy, 1985; Lewis et al., 1988; Hicks and Courtois, 1990; Guidry, 1996; Limb et al., 2002). Furthermore, the morphology remained characteristic and consistent in subcultures (Fig. 1e) and also in the newly characterized Müller cell line eqMC-7 (Fig. 1f), which is in accordance with the human Müller cell line MIO M1 (Limb et al., 2002).

Expression of characteristic Müller cell markers, investigated by immunocytochemical fluorescence labelling, revealed the expected identification of these cultured cells as Müller cells (Fig. 2). Two well-documented markers for Müller cells, also defined for the horse retina (Deeg et al., 2006; Hauck et al., 2007; Eberhardt et al., 2011), were expressed in cultured cells of passage 1 as well as in eqMC-7 cells. These include GS (Fig. 2a,d) and vimentin (Fig. 2b,e). Within the retina, GS is exclusively present in Müller cells (Riepe and Norenberg, 1978) and is a key enzyme in the recycling of neurotransmitters released by neurons (Pow and Robinson, 1994). The stable expression of GS was reported from the human Müller cell line MIO M1 (Limb et al., 2002) and the rat Müller cell line TR-MUL (Tomi et al., 2003), whereas studies on freshly isolated porcine (Hauck et al., 2003) and rabbit (McGillem et al., 1998) Müller cells reported a loss of GS within several days of culture.

The expression of the intermediate filament vimentin in eqMC-7 cells (Fig. 2e) reflects its expression pattern as already described in human, porcine and rabbit Müller cell cultures (Wakakura and Foulds, 1988; Guidry, 1996; Limb et al., 2002).

According to various reports that GFAP is expressed at low levels or is completely absent in mammalian and human Müller cells (Limb et al., 2002; Lupien et al., 2004; Sarthy, 2007), we could only detect a small number of eqMC-7 cells of passage 1 (Fig. 2c) expressing GFAP, not increasing in any subculture of the cell line eqMC-7 (Fig. 2f). However, in culture (Lewis et al., 1988; McGillem et al., 1998) and in various retinopathies (Bignami and Dahl, 1979; Eisenfeld et al., 1984; Bringmann and Reichenbach, 2001), this intermediate filament increases dramatically. Therefore, the absence of high levels of GFAP suggests that the eqMC-7 does not exhibit any characteristics of activation under *in vitro* conditions. Furthermore, GFAP is expressed at high levels in astrocytes (Hollander et al., 1991),

which are almost absent from the avascular equine retina (Schnitzer, 1988). No distinct level of GFAP immunoreactivity appeared in any subculture, meaning that a contamination of our Müller cell cultures with astroglia is very unlikely. Hence, the equine retina provides a reliable opportunity for obtaining astroglia-free Müller cell lines, as shown in the present study.

It has been reported that human, rabbit and porcine Müller cells undergo phenotypic changes under *in vitro* conditions, including *de novo* expression of microfilament  $\alpha$ -SM (Guidry, 1996; McGillem et al., 1998; Limb et al., 2002; Hauck et al., 2003). However, this cytoskeleton protein is normally not expressed by Müller cells. We found that eqMC-7 cells show a distinct immunoreactivity for  $\alpha$ -SM (Fig. 3a) under *in vitro* conditions, which is also consistent with reports of cultured retinal pigment epithelial cells (Grisanti and Guidry, 1995) and lens epithelial cells (Kurosaka et al., 1995) that do normally not contain  $\alpha$ -SM. It was demonstrated that  $\alpha$ -SM is necessary for the generation of tractional forces by fibroblasts (Arora and McCulloch, 1994), which was subsequently proven for cultured porcine Müller cells (Guidry, 1997). Therefore, the expression of  $\alpha$ -SM in eqMC-7 cells indicates their acquisition of contractile activity.

Furthermore, we show that eqMC-7 cells express the proliferation marker Ki67 (Fig. 3b) supporting the observed proliferation of the cells. This enables us to collect high amounts of cells for experiments where these are needed.

An important function of Müller cells within the retina is the regulation of the retinal potassium and water homeostasis (Reichenbach et al., 1993). Therefore, Müller cells are endowed with special membrane channels, including the inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 and the water channel AQP4 (Newman, 1993; Nagelhus et al., 1998; Kofuji et al., 2000). Recently, we could demonstrate that the distribution of the membrane channels Kir4.1 and AQP4 within the equine Müller cell differ from that of other mammalian Müller cells, indicating a different mechanism of regulating potassium and water homeostasis within the retina (Eberhardt et al., 2011). In the present study, we demonstrated that eqMC-7 cells express the membrane channel proteins Kir4.1 (Fig. 3c) and AQP4 (Fig. 3d), which indicates that eqMC-7 cells still exhibit their membrane properties *in vitro*. This result emphasizes the suitability of the cell line eqMC-7 for further studies on their physiological membrane characteristics, particularly the functional elucidation of the most

important membrane channel proteins Kir4.1 and AQP4.

In conclusion, the present study introduces the eqMC-7, which retains characteristic properties of Müller cells *in vitro*. Investigations on the physiology of the equine Müller cells will be greatly improved by the availability of this cell line, furthermore providing a resource to study their alterations in pathological situations.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft – SFB 571/A5 Deeg and DFG DE 719/2-2.

### References

- Arora, P. D.; McCulloch, C. A., 1994: Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* **159**, 161–175.
- Bignami, A.; Dahl, D., 1979: The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Experimental Eye Research* **28**, 63–69.
- Brand, S.; Hanke, W., 1996: Properties of retinal glial cell potassium channels. *Journal für Hirnforschung* **37**, 73–79.
- Brew, H.; Attwell, D., 1987: Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* **327**, 707–709.
- Bringmann, A.; Reichenbach, A., 2001: Role of Muller cells in retinal degenerations. *Frontiers in Bioscience* **6**, E72–E92.
- Bringmann, A.; Pannicke, T.; Grosche, J.; Francke, M.; Wiedemann, P.; Skatchkov, S. N.; Osborne, N. N.; Reichenbach, A., 2006: Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research* **25**, 397–424.
- Bringmann, A.; Iandiev, I.; Pannicke, T.; Wurm, A.; Hollborn, M.; Wiedemann, P.; Osborne, N. N.; Reichenbach, A., 2009a: Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research* **28**, 423–451.
- Bringmann, A.; Pannicke, T.; Biedermann, B.; Francke, M.; Iandiev, I.; Grosche, J.; Wiedemann, P.; Albrecht, J.; Reichenbach, A., 2009b: Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry International* **54**, 143–160.
- Bull, N. D.; Limb, G. A.; Martin, K. R., 2008: Human Muller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **49**, 3449–3456.
- Deeg, C. A., 2008: Ocular immunology in equine recurrent uveitis. *Veterinary Ophthalmology* **11**(Suppl 1), 61–65.
- Deeg, C. A.; Amann, B.; Hauck, S. M.; Kaspers, B., 2006: Defining cytochemical markers for different cell types in the equine retina. *Anatomia Histologia and Embryologia* **35**, 412–415.
- Deeg, C. A.; Raith, A. J.; Amann, B.; Crabb, J. W.; Thurau, S. R.; Hauck, S. M.; Ueffing, M.; Wildner, G.; Stangassinger, M., 2007: CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clinical and Developmental Immunology* **2007**, 39245.
- Derouiche, A.; Rauen, T., 1995: Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *Journal of Neuroscience Research* **42**, 131–143.
- Dreher, Z.; Robinson, S. R.; Distler, C., 1992: Muller cells in vascular and avascular retinæ: a survey of seven mammals. *The Journal of Comparative Neurology* **323**, 59–80.
- Eberhardt, C.; Amann, B.; Feuchtinger, A.; Hauck, S. M.; 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**, 697–707.
- Eisenfeld, A. J.; Bunt-Milam, A. H.; Sarthy, P. V., 1984: Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **25**, 1321–1328.
- Grisanti, S.; Guidry, C., 1995: Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **36**, 391–405.
- Guidry, C., 1996: Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **37**, 740–752.
- Guidry, C., 1997: Tractional force generation by porcine Muller cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **38**, 456–468.
- Harada, T.; Harada, C.; Watanabe, M.; Inoue, Y.; Sakagawa, T.; Nakayama, N.; Sasaki, S.; Okuyama, S.; Watase, K.; Wada, K.; Tanaka, K., 1998: Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4663–4666.
- Hauck, S. M.; Suppmann, S.; Ueffing, M., 2003: Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals

- a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. *Glia* **44**, 251–263.
- Hauck, S. M.; Schoeffmann, S.; Amann, B.; Stangassinger, M.; Gerhards, H.; Ueffing, M.; Deeg, C. A., 2007: Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *Journal of Proteome Research* **6**, 2121–2131.
- Hicks, D.; Courtois, Y., 1990: The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Experimental Eye Research* **51**, 119–129.
- Hollander, H.; Makarov, F.; Dreher, Z.; van Driel, D.; Chan-Ling, T. L.; Stone, J., 1991: Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells. *The Journal of Comparative Neurology* **313**, 587–603.
- Hollborn, M.; Jahn, K.; Limb, G. A.; Kohen, L.; Wiedemann, P.; Bringmann, A., 2004: Characterization of the basic fibroblast growth factor-evoked proliferation of the human Muller cell line, MIO-M1. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **42**, 414–422.
- Ishii, M.; Horio, Y.; Tada, Y.; Hibino, H.; Inanobe, A.; Ito, M.; Yamada, M.; Gotow, T.; Uchiyama, Y.; Kurachi, Y., 1997: Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *Journal of Neuroscience* **17**, 7725–7735.
- Kofuji, P.; Ceelen, P.; Zahs, K. R.; Surbeck, L. W.; Lester, H. A.; Newman, E. A., 2000: Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *Journal of Neuroscience* **20**, 5733–5740.
- Kurosaka, D.; Kato, K.; Nagamoto, T.; Negishi, K., 1995: Growth factors influence contractility and alpha-smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **36**, 1701–1708.
- Lawrence, J. M.; Singhal, S.; Bhatia, B.; Keegan, D. J.; Reh, T. A.; Luthert, P. J.; Khaw, P. T.; Limb, G. A., 2007: MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells* **25**, 2033–2043.
- Lewis, G. P.; Kaska, D. D.; Vaughan, D. K.; Fisher, S. K., 1988: An immunocytochemical study of cat retinal Muller cells in culture. *Experimental Eye Research* **47**, 855–868.
- Limb, G. A.; Salt, T. E.; Munro, P. M.; Moss, S. E.; Khaw, P. T., 2002: In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **43**, 864–869.
- Lupien, C.; Brenner, M.; Guerin, S. L.; Salesse, C., 2004: Expression of glial fibrillary acidic protein in primary cultures of human Muller cells. *Experimental Eye Research* **79**, 423–429.
- Malgorzata Goczalik, I.; Raap, M.; Weick, M.; Milenkovic, I.; Heidmann, J.; Enzmann, V.; Wiedemann, P.; Reichenbach, A.; Francke, M., 2005: The activation of IL-8 receptors in cultured guinea pig Muller glial cells is modified by signals from retinal pigment epithelium. *Journal of Neuroimmunology* **161**, 49–60.
- McGillem, G. S.; Guidry, C.; Dacheux, R. F., 1998: Antigenic changes of rabbit retinal Muller cells in culture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **39**, 1453–1461.
- Nagelhus, E. A.; Veruki, M. L.; Torp, R.; Haug, F. M.; Laake, J. H.; Nielsen, S.; Agre, P.; Ottersen, O. P., 1998: Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *Journal of Neuroscience* **18**, 2506–2519.
- Nagelhus, E. A.; Horio, Y.; Inanobe, A.; Fujita, A.; Haug, F. M.; Nielsen, S.; Kurachi, Y.; Ottersen, O. P., 1999: Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* **26**, 47–54.
- Newman, E. A., 1985: Membrane physiology of retinal glial (Muller) cells. *Journal of Neuroscience* **5**, 2225–2239.
- Newman, E. A., 1987: Distribution of potassium conductance in mammalian Muller (glial) cells: a comparative study. *Journal of Neuroscience* **7**, 2423–2432.
- Newman, E. A., 1993: Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *Journal of Neuroscience* **13**, 3333–3345.
- Newman, E.; Reichenbach, A., 1996: The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences* **19**, 307–312.
- Pow, D. V.; Robinson, S. R., 1994: Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience* **60**, 355–366.
- Reichenbach, A.; Stolzenburg, J. U.; Eberhardt, W.; Chao, T. I.; Dettmer, D.; Hertz, L., 1993: What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *Journal of Chemical Neuroanatomy* **6**, 201–213.
- Riepe, R. E.; Norenberg, M. D., 1978: Glutamine synthetase in the developing rat retina: an immunohistochemical study. *Experimental Eye Research* **27**, 435–444.
- Sarthy, P. V., 1985: Establishment of Muller cell cultures from adult rat retina. *Brain Research* **337**, 138–141.
- Sarthy, V., 2007: Focus on molecules: glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Experimental Eye Research* **84**, 381–382.
- Scherer, J.; Schnitzer, J., 1989: The rabbit retina: a suitable mammalian tissue for obtaining astroglia-free Muller cell cultures. *Neuroscience Letters* **97**, 51–56.

- Schnitzer, J., 1988: Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia* **1**, 74–89.
- Tomi, M.; Funaki, T.; Abukawa, H.; Katayama, K.; Kondo, T.; Ohtsuki, S.; Ueda, M.; Obinata, M.; Terasaki, T.; Hosoya, K., 2003: Expression and regulation of L-cystine transporter, system xc-, in the newly developed rat retinal Muller cell line (TR-MUL). *Glia* **43**, 208–217.
- Wakakura, M.; Foulds, W. S., 1988: Immunocytochemical characteristics of Muller cells cultured from adult rabbit retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **29**, 892–900.
- Winkler, B. S.; Arnold, M. J.; Brassell, M. A.; Puro, D. G., 2000: Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **41**, 3183–3190.
- Yong, P. H.; Zong, H.; Medina, R. J.; Limb, G. A.; Uchida, K.; Stitt, A. W.; Curtis, T. M., 2010: Evidence supporting a role for N-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine accumulation in Muller glia dysfunction and death in diabetic retinopathy. *Molecular Vision* **16**, 2524–2538.
- Yu, D. Y.; Cringle, S. J., 2001: Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Progress in Retinal and Eye Research* **20**, 175–208.

## 5 DISKUSSION

Aufzeichnungen über die equine rezidivierende Uveitis gibt es in der Veterinärmedizin schon seit Jahrhunderten, doch bis heute konnte weder die Ätiologie noch die Pathogenese dieser Erkrankung vollständig bewiesen werden (Paglia et al. 2004; Spiess 2010). Die für die ERU charakteristischen wiederkehrenden Entzündungsschübe gehen mit erheblichen Schmerzen und Leiden für das betroffene Tier einher und führen zu fortschreitender Zerstörung der intraokulären Strukturen, die im Endstadium den Verlust der Sehfähigkeit herbeiführt (Romeike et al. 1998; Spiess 1997). Mit einer Prävalenz von 8 - 10% ist die ERU die häufigste Ursache für eine erworbene Blindheit bei Pferden (Deeg 2008; Spiess 2010). Das auf die visuelle Wahrnehmung angewiesene Fluchttier kann durch eine Erblindung sein natürliches Verhalten nicht länger artgerecht ausüben und stellt folglich eine Gefahr für sich selbst und seine Umwelt dar. Aufgrund dessen und der entzündungsbedingten erheblichen Schmerzen für das Tier ist nach der Erblindung im Endstadium der ERU eine Euthanasie, auch bei einem abgesehen von der ERU gesunden Tier, erforderlich.

Die ERU ist nicht nur in der Veterinärmedizin von Bedeutung, auch ist die Untersuchung dieser Erkrankung für die humanmedizinische Uveitisforschung von großem Nutzen. Das Pferd bezeichnet die einzige bekannte Spezies, welche eine der humanen autoimmun-medierten Uveitis vergleichbare Erkrankung spontan entwickelt (Deeg et al. 2008; Hauck et al. 2007). Die Ätiologie und Pathogenese der humanen autoimmun-medierten Uveitis, der vierthäufigsten Ursache für Erblindung beim Menschen, sind jedoch ebenfalls nicht ausreichend geklärt (Caspi 2010; Fiehn et al. 2003). Das Defizit an humanem Probenmaterial macht eine adäquate Erforschung dieser Erkrankung im primären Organismus nahezu unmöglich. Daher werden pathogenese-assoziierte Mechanismen dieser Erkrankung vorwiegend im Tiermodell untersucht. Die Experimentelle autoimmun Uveitis (EAU) hat sich insbesondere in verschiedenen Maus- und Rattenlinien als Modell für die humane autoimmun-medierte Uveitis etabliert (Caspi et al. 2008; Wildner et al. 2008). Jedoch ist dies eine experimentell induzierte Erkrankung, die einige Nachteile in der Repräsentation der spontan auftretenden Uveitis birgt. Beispielsweise verläuft die bei Lewis-Ratten durch das IRPB-Peptid R14 induzierte EAU typischerweise akut monophasisch (Diedrichs-Mohring et al. 2008). In verschiedenen EAU-Mausmodellen

können zwar Rezidive hervorgerufen werden, jedoch lassen sich diese weder beeinflussen noch vorhersagen (Caspi 2003). EAU Modelle haben zwar zu einem besseren Verständnis der Pathogenese-assoziierten Mechanismen beigetragen, jedoch ist deren Eignung für die Untersuchung des rezidivierenden Charakters der autoimmun-medierte Uveitis limitiert. Die ERU hingegen, vereint zwei den EAU Modellen fehlende Eigenschaften. Das Pferd ist die einzige bekannte Spezies, die eine rezidivierende Uveitis spontan entwickelt und fungiert somit als spontanes Tiermodell für autoimmun-medierte Uveitis (Deeg et al. 2007c; Hines 1984). Außerdem ist die ERU experimentell induzierbar und zeigt im Gegensatz zu EAU Modellen einen rezidivierenden Verlauf (Deeg et al. 2007c; Deeg et al. 2002b). Somit bietet die ERU die einmalige Möglichkeit, sowohl die der spontanen Erkrankung zugrundeliegende Pathogenese zu erforschen, als auch parallel einen Vergleich in der experimentell induzierten ERU durchzuführen. Das spontane Tiermodell erlaubt zudem die Erforschung und den Vergleich verschiedener Krankheitsstadien, da der Zugang zu Probenmaterial von an ERU erkrankten Pferden in allen Phasen der Erkrankung gesichert ist.

Die Retina stellt das primäre Zielorgan der autoimmun-medierte Uveitis dar. Sie weist bereits im Anfangsstadium der ERU im Bereich der Photorezeptoren Läsionen auf, welche im Verlauf der Erkrankung im gesamten Zielgewebe gefunden werden (Deeg et al. 2002a). Die Retina als Teil des Zentralnervensystems ist nach Zerstörungen jedoch unfähig sich vollständig zu regenerieren und bleibt daher nicht nur strukturell, sondern auch funktionell beeinträchtigt. Besonders bei der IRBP und der CRALBP induzierten ERU wurde eine massive Zerstörung der retinalen Architektur gefunden (Deeg et al. 2006b; Deeg et al. 2002b). Hingegen löste die Immunisierung von Pferden mit dem Autoantigen S-Ag zwar eine Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie aus, jedoch konnte eine Invasion von okulären Strukturen in den meisten Fällen nicht nachgewiesen werden (Deeg et al. 2004). Die Autoreaktivität der CD4<sup>+</sup> Th1-Lymphozyten, welche die Blut-Retina-Schranke überwunden haben, richtet sich hauptsächlich gegen retinale Proteine. Dies wurde sowohl bei der ERU (Deeg et al. 2006a; Deeg et al. 2006b), als auch bei der autoimmun-medierte Uveitis des Menschen (Caspi et al. 1988; de Smet et al. 2001) nachgewiesen. Obwohl deutlich wird, dass die Retina eine zentrale Rolle bei der ERU spielt, sind insbesondere die Pathogenese-assoziierten Mechanismen auf molekularer Ebene im Zielorgan selbst weitgehend unklar (Hauck et al. 2007). Daher

bedarf es der grundlegenden Untersuchung der uveitischen Retina und deren zellulärer Anteile im Speziellen.

In einer vorherigen Studie wurde im Zuge histopathologischer Untersuchungen der Retina von an ERU erkrankten Pferden insbesondere die Wichtigkeit der Müllerzelle bei der ERU erkannt. Diese stellten die einzige Zellart der Retina dar, welche, trotz weitgehender Zerstörung neuronaler Zellen, noch erhalten war (Deeg et al. 2002a). Diese Erkenntnis wurde bestätigt durch den Vergleich des Retinaproteoms von gesunden Pferden mit dem von an ERU erkrankten Pferden mittels 2D-PAGE und anschließender massenspektrometrischer Identifikation differenziell regulierter Proteine (Hauck et al. 2007). Dabei wurden 12 höher exprimierte Proteine in ERU Proben detektiert, unter welchen sich auch das Müllerzell-spezifische Intermediärfilament glial fibrillary acidic protein (GFAP) fand (Hauck et al. 2007). Die vermehrte Expression dieses Proteins ist charakteristisch für eine Aktivierung von Müllerzellen und ist ein Marker für eine frühe unspezifische gliotische Reaktion (Bignami and Dahl 1979; Bringmann and Reichenbach 2001). Weitere Untersuchungen Müllerzell-spezifischer Proteine bei der ERU zeigten eine vermehrte Expression des Intermediärfilaments Vimentin und eine geringere Expression des Enzyms Glutamin Synthetase (GS) bei der ERU im Vergleich zu Kontrollen (Hauck et al. 2007). Diese charakteristischen Veränderungen der Müllerzelle weisen deutlich auf eine Gliose in der uveitischen Retina hin. In der vorliegenden Studie konnte das Auftreten von Gliose bei der ERU mit der Quantifizierung von Vimentin mittels Western Blot und mit immunhistochemischen Färbungen von Vimentin und GS in gesunden und uveitischen Retinae bestätigt werden. Charakteristisch für gliotische Müllerzellen konnte eine signifikant erhöhte Expression von Vimentin (Abb. 1A, 2C, 2D, 2I, 2J, Publikation I) und eine stark verminderte Expression von GS (Abb. 4C, 4D, 4I, 4J, Publikation I) in uveitischen Proben im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden.

Gliose ist ein zellulärer Versuch den Gewebeverband weitgehend zu erhalten, um so das Ausmaß der Schädigung, welche folglich eine beeinträchtigte Funktion des Gewebes bedeuten würde, so gering wie möglich zu halten (Liberto et al. 2004). Sie tritt praktisch bei allen bekannten pathologischen Veränderungen der Retina wie beispielsweise diabetischer Retinopathie, Makuladegeneration, Glaukom, Trauma und Ischämie auf (Bringmann et al. 2009a). Die Auswirkungen der Gliose auf die Retina und die Neurone sind jedoch mit Vor- und Nachteilen behaftet. Während

Gliose in frühen Stadien der Erkrankung überwiegend neuroprotektiv ist, führt der Verlust spezifischer Funktionen der Müllerzelle in späteren, schweren Stadien der Erkrankung zur Schädigung von Neuronen. Insbesondere wenn die konservative Gliose in eine proliferative Form übergeht, welche durch Proliferation, Migration und die Entstehung einer gliösen Narbe gekennzeichnet ist, verhindern Müllerzellen die Regeneration des Nervengewebes. Somit kann die Gliose auch zum permanenten Verlust der retinalen Funktion beitragen (Bringmann et al. 2006; Bringmann and Reichenbach 2001). Daher sind die Reaktionen der Müllerzelle bedeutend für ein besseres Verständnis der Pathogenese-assoziierten Mechanismen im Manifestationsorgan der Uveitis (Hauck et al. 2007). Jedoch stehen neben den charakteristischen morphologischen Veränderungen der Müllerzelle bei der ERU und dem Verlust der Expression von GS keine weiteren Daten zur Funktionalität der gliotischen Müllerzelle bei der ERU zur Verfügung (Pubmed Recherche Stand 01. April 2011). Im Fokus dieser Studie stand deshalb die nähere Charakterisierung der in der ERU auftretenden Gliose mittels Untersuchung weiterer Müllerzell-spezifischer Proteinexpressionsänderungen in uveitischen Retinae. Eine Veränderung des Proteinexpressionsmusters weist auf eine potenziell funktionale Modifikation der Müllerzelle hin und dient somit als Grundlage für ein besseres Verständnis der Pathogenese-assoziierten Vorgänge im Zielorgan der Uveitis. Um Hinweise auf potenzielle Veränderungen von Müllerzell-spezifischen Proteinen bei der ERU zu erlangen, wurden Daten einer zuvor publizierten Studie herangezogen, welche durch die vergleichende proteomische Analyse des Membranproteoms der Retina eines gesunden und eines an ERU erkrankten Pferdes mittels neuester massenspektrometrischer Techniken entstanden (Hauck et al. 2010). Retinale Membranproteine sind besonders interessant für die Pathogenese der ERU, da autoaggressive T-Zellen die Netzhaut angreifen und dies möglicherweise durch Veränderungen von Proteinen der Zelloberfläche ausgelöst werden könnte. Der Vergleich der Membranproteinfraktion, im Gegensatz zum Gesamtproteom der Retina, hat den Vorteil, dass sich die massenspektrometrischen Identifikationen differenziell abundanter Proteine fast ausschließlich auf die des Zielgewebes beziehen (Hauck et al. 2010). Beim Vergleich der retinalen Gesamtproteome wurden vorwiegend differenziell regulierte Serumproteine gefunden, da diese durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke in das retinale Gewebe eingeströmt waren (Hauck et al. 2007). Die vergleichende Analyse der retinalen

Membranproteome stellt somit einen besser geeigneten Ansatz dar, um Rückschlüsse auf ablaufende, Pathogenese-assoziierte Mechanismen im Zielorgan der ERU zu ziehen. Nichtsdestotrotz bleibt auch bei diesem Ansatz eine kleinere Teilfraktion nicht retinalen Ursprungs, die beispielsweise Membranproteine infiltrierter Zellen umfassen kann, zu berücksichtigen.

Der Einsatz von Techniken der Proteomforschung stellt ein überaus geeignetes Mittel dar, das Verständnis molekularer Prozesse in komplexen Geweben wie der Retina zu verbessern (Lam et al. 2008). Auch die Forschung auf dem Gebiet verschiedener Erkrankungen wie beispielsweise Multiple Sklerose (Hammack et al. 2004), Diabetes (Sparre et al. 2003) und die Alzheimer-Krankheit (Butterfield 2004) bedient sich der Proteomik, um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen zu ermöglichen. Der Forschungsbereich, in welchem proteomische Techniken momentan wahrscheinlich am häufigsten Anwendung finden, ist die Krebsforschung (Pastwa et al. 2007). Der Einsatz von umfassenden proteomischen Analysen hat sich unter anderem in der Untersuchung von Immunreaktionen (Purcell and Gorman 2004) und auf dem Gebiet der Neurowissenschaften (Wilson et al. 2004) etabliert. Bei der ERU durchgeführte systematisch vergleichende Analysen intraokulärer Proteome ermöglichten bereits die Identifizierung einiger differenziell regulierter Proteine, wodurch wichtige an der Pathogenese beteiligte Signalwege aufgedeckt wurden (Deeg et al. 2007a; Hauck et al. 2007; Hofmaier et al. 2011). Hinweise auf eine Beteiligung des Komplementsystems an der autoimmunen Uveitis und ein potenzieller Biomarker wurde erstmals durch die proteomische Analyse von Serum gefunden (Zipplies et al. 2009; Zipplies et al. 2010). Dies macht deutlich, dass die ganzheitliche, vergleichende proteomische Analyse eines komplexen Gewebes oder einer Flüssigkeit zur Aufdeckung von molekularen Prozessen, welche einer Erkrankung zugrunde liegen, führt und somit ein besseres Verständnis der Pathogenese ermöglicht. Folglich bietet dieser Ansatz auch eine ausgezeichnete Möglichkeit, die molekularen Vorgänge im Zielgewebe der ERU zu untersuchen, wodurch auch Hinweise auf die Beteiligung Müllerzell-spezifischer Funktionen erhalten werden können.

Der für diese Arbeit verwendete Datensatz entstand durch die quantitative, Label-freie Analyse von retinalen Membranproteinen eines gesunden und eines an ERU erkrankten Pferdes, wobei unter Verwendung einer LTQ Orbitrap insgesamt 893

---

Proteine identifiziert wurden. Die 334 differenziell exprimierten Proteine umfassten 172 vermehrt exprimierte und 162 vermindert exprimierte Proteine bei der ERU (Hauck et al. 2010). Neben anderen interessanten Kandidaten wurde unter diesen differenziell regulierten Proteinen auch eine Gruppe Müllerzell-spezifischer Proteine entdeckt. Als besonders interessant haben wir zwei Proteine dieser Gruppe erachtet, welche unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation der retinalen Kalium- und Wasserhomöostase spielen. Dabei handelt es sich um den einwärtsgerichteten Kaliumkanal Kir4.1 und den Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4) (Nagelhus et al. 1999). Während Kir4.1 nahezu 10-fach vermindert exprimiert gefunden wurde, war die Expression von AQP4 um das 2,4-fache erhöht bei der ERU im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 1, Publikation I). Dies ist ein entscheidender Hinweis auf eine gestörte Regulation der retinalen Kalium- und Wasserhomöostase, welche den Müllerzellen obliegt, und würde eine Beeinträchtigung einer ihrer wichtigsten physiologischen Funktionen bedeuten (Reichenbach et al. 1993). Auch sind diese Befunde interessant, da eine beeinträchtigte retinale Kalium- und Wasserhomöostase zum einen ein retinales Ödem (Reichenbach et al. 2007) und zum anderen eine neuronale Hyperexzitation mit folgender Schädigung der Nervenzellen durch Glutamattoxizität verursachen könnte (Francke et al. 2001; Francke et al. 2005). Die veränderte Expression von Kir4.1 und AQP4 wurde in diesem Eingangsexperiment zum ersten Mal in Zusammenhang mit der ERU beschrieben (Hauck et al. 2010). Jedoch wurde diese Studie mit einer sehr geringen Probenzahl durchgeführt, weshalb in der vorliegenden Arbeit zunächst die massenspektrometrisch erhaltenen Ergebnisse mittels anderer Methoden in einer höheren Probenanzahl verifiziert und anschließend weiter charakterisiert werden sollten.

Die Quantifizierung des Kaliumkanals Kir4.1 wurde mittels Western Blot in einer größeren Anzahl von Proben gesunder und an ERU erkrankter Pferde durchgeführt. Die signifikant verminderte Expression von Kir4.1 in Gesamtretnalysaten von allen getesteten, an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu Kontrollen bestätigte das Ergebnis aus unserer vorangegangenen Studie (Abb. 1B, Publikation I). Diese Quantifizierung bezog sich jedoch auf das vollständige Retinaproteom und erlaubte keine Aussage über die Kir4.1 Regulation an der gliotischen Müllerzelle. Zwar wird Kir4.1 in Retinae von Ratten, Mäusen und Kaninchen hauptsächlich von Müllerzellen exprimiert (Ishii et al. 1997; Kofuji et al. 2002), jedoch sind keine Daten zum

Expressionsmuster dieses Kanals in der Retina des Pferdes verfügbar (Pubmed Recherche 01. April 2011). Daher wurde in dieser Arbeit auch das Expressionsmuster von Kir4.1 in gesunden und uveitischen Retinae des Pferdes immunhistochemisch untersucht. Für die gesunde avaskuläre equine Retina wurde in dieser Studie erstmals die ausschließliche Expression des Kaliumkanals Kir4.1 entlang der gesamten Länge der Müllerzelle gezeigt (Abb. 2E und 2I, Publikation I). Somit ist die Quantifizierung dieses Proteins im Gesamtretnalysat repräsentativ für die Müllerzelle und beweist, dass die veränderte Expression von Kir4.1 bei der ERU auf die Müllerzelle zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu anderen untersuchten Spezies (wie beispielsweise Maus und Ratte), die eine vermehrte Expression von Kir4.1 in Müllerzellmembranen, welche an intraretinale Blutgefäße und den Glaskörper grenzen, zeigen (Ishii et al. 1997; Nagelhus et al. 1999), ist interessanterweise beim Pferd ein kontinuierliches Expressionsmuster entlang der Müllerzelle aufgefallen (Abb. 2E und 2I, Publikation I). Da Kir4.1 eine bedeutende Rolle in der Regulation des retinalen Kaliumhaushaltes spielt, könnte diese divergente Expression möglicherweise einen beim Pferd veränderten Mechanismus des beschriebenen  $K^+$ -Siphonings (s. Kapitel 2.4.2.3) bedeuten (Newman 1984). Bei diesem für die Retina beschriebenen Mechanismus strömt Kalium, das von Nervenzellen während der Exzitation freigesetzt wurde, von Regionen hoher Kaliumkonzentration ( $[K^+]_o$ ) (plexiforme Schichten) durch die Müllerzelle in drei verschiedene Regionen, die als Kaliumabfluss dienen. Diese umfassen den Glaskörper, die intraretinalen Blutgefäße und den subretinalen Spalt (Newman and Reichenbach 1996; Newman 1985; Reichenbach et al. 1992). Um den Ausstrom von Kalium zu ermöglichen, exprimieren Müllerzellen in Membranen, welche an die Kaliumabflüsse grenzen, den Kaliumkanal Kir4.1 (Kofuji et al. 2002). Da das Pferd eine avaskuläre Retina aufweist (Schnitzer 1988), fehlt ihm die Möglichkeit des intraretinalen Kaliumabflusses in Blutgefäße. Diese Tatsache in Verbindung mit der divergenten Expression von Kir4.1 könnte ein Hinweis für das Auftreten des ursprünglich im Gehirn beschriebenen  $K^+$ -spatial buffering (Orkand et al. 1966) sein. Hierbei wird Kalium über das Gliasynzytium von lokalen  $[K^+]_o$  Erhöhungen in Regionen mit niedriger  $[K^+]_o$  umverteilt. Kir4.1 ist ein nur schwach einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal, der Ein- und Auswärtsströme gleichermaßen bewerkstelligen kann (Takumi et al. 1995). Durch die gleichmäßige Expression von Kir4.1 entlang der Müllerzelle wäre ein Kaliumstrom über das Müller-Gliasynzytium in

---

der equinen Retina denkbar. Elektrophysiologische Untersuchungen isolierter Müllerzellen würden sich als Methode eignen, die Verteilung der Permeabilität für Kalium entlang der Müllerzellmembran zu untersuchen, um Aufschluss über den Mechanismus der Kaliumumverteilung in der equinen Retina zu erlangen. Mit der Etablierung der ersten equinen Müllerzelllinie eqMC-7 (Publikation II) ist die Grundvoraussetzung für dieses Vorhaben erfüllt.

Neben dieser ersten sehr interessanten Erkenntnis wurde beim Vergleich von immunhistochemischen Färbungen des Kaliumkanals Kir4.1 in gesunden mit uveitischen Retinae ein nahezu vollkommener Verlust der Kir4.1 Expression in den gliotischen Müllerzellen von erkrankten Retinae gefunden (Abb. 2F und 2J, Publikation I). Dieser Befund bestätigt das durch Massenspektrometrie und Western Blot erhaltene Ergebnis. Eine verminderte Expression von Kir4.1 wurde neben diversen Tiermodellen für verschiedene Retinopathien wie beispielsweise diabetischer Retinopathie der Ratte (Pannicke et al. 2006), Ischämie bei Maus und Ratte (Hirrlinger et al. 2010; Iandiev et al. 2006a) und Netzhautablösung beim Schwein (Iandiev et al. 2006b), auch bei Ratten mit endotoxin-induzierter Uveitis (Liu et al. 2007) beschrieben.

Die Expression des Kaliumkanals Kir4.1 ist für die charakteristische extrem hohe Permeabilität der Müllerzellmembran für Kaliumionen ausschlaggebend (Kofuji et al. 2000) und erzeugt das stark negative Ruhemembranpotenzial (RMP) der Müllerzelle, das nahezu dem Gleichgewichtspotenzial von Kalium entspricht (Witkovsky et al. 1985). In einer Kir4.1<sup>-/-</sup> Mauslinie konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität der Müllerzellmembran für Kalium dramatisch sinkt im Vergleich zu einer Kir4.1<sup>+/+</sup> Mauslinie (Kofuji et al. 2000). Außerdem zeigten diese Müllerzellen ein stark depolarisiertes RMP von bis zu -13 mV, während dieses normalerweise bei stark hyperpolarisierten Werten um -85 mV liegt (Newman 1987). Auch bei verschiedenen Retinopathien wie beispielsweise Netzhautablösung, proliferativer Retinopathie oder Glaukom wurden verminderte Kaliumströme bei gliotischen Müllerzellen beschrieben, welche zu einem Anstieg der Kaliumkonzentration im EZR und somit zu einem vermehrt depolarisierten RMP führten (Bringmann et al. 2000; Francke et al. 2001; Reichelt et al. 1997). Für viele Funktionen der Müllerzelle ist jedoch ein hyperpolarisiertes RMP erforderlich (Bringmann et al. 2006). Beispielsweise ist für die äußerst wichtige Funktion des Neurotransmitter-Recyclings ein stark negatives RMP obligatorisch (Bringmann et al. 2009b). Der Glutamat-Transporter GLAST, über

welchen Müllerzellen 50% des Neurotransmitters Glutamat aufnehmen (Sarthy et al. 2005) ist elektrogen und ist demnach nur bei einem ausreichend negativen RMP ausreichend effektiv (Brew and Attwell 1987; Pannicke et al. 1994). Die verminderte Expression des Kaliumkanals Kir4.1 in der gliotischen Müllerzelle weist demzufolge auf eine gesenkte Kaliumpermeabilität bei der ERU hin und führt möglicherweise zu einer Ansammlung von Glutamat im synaptischen Spalt, welches in hohen Konzentrationen toxisch für die Nervenzelle ist.

Eine ausgeprägte Abnahme der Kaliumpermeabilität von Müllerzellen wurde außerdem in Zusammenhang mit einem Übergang von der konservativen zur proliferativen Form der Gliose gestellt, da proliferierende gliotische sowie heranreifende Müllerzellen ihre Kaliumpermeabilität auf etwa 5% der Werte reifer Müllerzellen reduzieren (Bringmann et al. 2000). Auch in einer Studie der proliferativen Retinopathie, die durch proliferative Gliose gekennzeichnet ist, waren Kaliumströme in der Müllerzelle stark reduziert (Ulbricht et al. 2008). Bei der autoimmun-medierten Uveitis könnte ein Übergang von der konservativen zur proliferativen Gliose durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke ausgelöst werden, da dem Blut entstammende Faktoren wie Thrombin die von Kir-Kanälen medierte Kaliumströme massiv inhibieren (Puro and Stuenkel 1995). Daraus lässt sich schließen, dass eine verminderte Expression von Kir4.1 in gliotischen Müllerzellen bei der ERU in Verbindung mit einem Übergang der neuroprotektiven Gliose in eine proliferative und somit schädigende Form stehen könnte. Es bleibt zu untersuchen, ob der Grad der verminderten Kir4.1 Expression eine Aussage über das Stadium der Gliose erlaubt. Interessanterweise ergab sich bei der Quantifizierung von Kir4.1 in ERU Proben mittels Western Blot eine ausgeprägte Standardabweichung (Abb. 1B, Publikation I). Da diese Proben Tieren verschiedenster Krankheitsstadien entstammen, könnte die Standardabweichung möglicherweise eine fortschreitende Verminderung der Kir4.1 Expression repräsentieren und folglich einen progressiven Verlauf der Gliose bedeuten.

Die Permeabilität der Müllerzellmembran für Kalium ist zudem von besonderer Wichtigkeit für die Regulation der retinalen Kaliumhomöostase. Neben dem schwach einwärtsgerichteten Kaliumkanal Kir4.1 ist auch der Müllerzell-spezifische stark einwärtsgerichtete Kaliumkanal Kir2.1 an der Vermittlung von Kaliumströmen durch die Müllerzelle beteiligt (Kofuji et al. 2002). Die verminderte Expression von Kir4.1 gibt bereits einen deutlichen Hinweis auf eine eingeschränkte Funktion der

Müllerzelle bei der ERU, die auch eine beeinträchtigte retinale Kaliumhomöostase zur Folge haben dürfte. Um diese Beeinträchtigung genauer beurteilen zu können, wurde in der vorliegenden Studie neben Kir4.1 auch der Kaliumkanal Kir2.1 untersucht. Die Quantifizierung von Kir2.1 mittels Western Blot ließ eine signifikante Erhöhung der Expression dieses Kanals in Gesamtretnalysaten von an ERU erkrankten im Vergleich zu gesunden Pferden erkennen (Abb. 1C, Publikation I). Dies ist ein interessanter Befund, da Studien in postischämischen Ratten eine unveränderte Expression von Kir2.1 im Vergleich zu Kontrollen belegten (Iandiev et al. 2006a), während bei einem Kaninchenmodell für proliferative Vitreoretinopathie sogar eine Abnahme beschrieben wurde (Ulbricht et al. 2008). Die Zunahme der Expression bei der autoimmun-medierten Uveitis stellt daher einen für die Auswirkung auf die retinale Kaliumhomöostase überaus interessanten Befund dar. Da das Expressionsmuster von Kir2.1 in der Retina des Pferdes bisher völlig unbekannt ist (Pubmed Recherche Stand 01. April 2011) und die erhöhte Expression von Kir2.1 weiterer Untersuchungen bedarf, wurden immunhistochemische Färbungen gesunder und uveitischer Retinae durchgeführt. In dieser Studie konnte in der equinen Retina erstmals eine Expression des Kaliumkanals Kir2.1 entlang der Müllerzellen gezeigt werden (Abb. 2G und 2I, Publikation I). Die Expression von Kir2.1 in Stammfortsätzen sowie in Sekundärfortsätzen, welche in engem Kontakt zu Neuronen stehen und diese umschließen, ist weitgehend konform mit Studien in Mäusen und Ratten (Iandiev et al. 2006a; Kofuji et al. 2002). Jedoch stellt die in die Körnerschichten verschobene Expression in uveitischen Retinae einen neuartigen Befund dar, der in der Literatur bisher für keine Retinopathie derart beschrieben wurde (Pubmed Recherche 01. April 2011). Daher sollte das veränderte Expressionsmuster und dessen Bedeutung bei der ERU genauer untersucht werden. Die vermehrte Expression von Kir2.1 in Verbindung mit der erniedrigten Expression von Kir4.1 in uveitischen Retinae weist eindeutig auf eine gestörte Regulation der retinalen Kaliumhomöostase bei der ERU hin. Kir2.1 ist ein stark einwärtsgerichteter Kaliumkanal, der hauptsächlich Einwärtsströme vermittelt, während Kir4.1 zu den schwach einwärtsgerichtenden Kir-Kanälen zählt, die Ein- und Auswärtsströme gleichermaßen bewerkstelligen (Olsen and Sontheimer 2008). Durch die Verteilung der Kaliumkanäle in der Müllerzellmembran wird vermutet, dass Kalium, welches von Neuronen bei der Exzitation im Bereich der Synapsen in den Extrazellulärraum freigesetzt wird, über den Kir2.1 Kanal aufgenommen und über

---

den Kir4.1 Kanal in Regionen geringerer Kaliumkonzentrationen wieder abgegeben wird (Kofuji et al. 2002). Die veränderte Expression dieser Kaliumkanäle bei der ERU könnte bedeuten, dass unter diesen pathologischen Bedingungen Müllerzellen das freigesetzte Kalium zwar über den Kir2.1 Kanal aufnehmen können, jedoch die Abgabe dieses überschüssigen Kaliums eingeschränkt ist. Das Resultat dieser gestörten Kalium Regulation dürfte eine intrazelluläre Ansammlung von Kalium sein, die zu einem erhöhten osmotischen Druck in der Müllerzelle führen würde. Eine Erhöhung des osmotischen Druckes hat Auswirkungen auf den intraretinalen Transport von Wasser, der an osmotisch wirkende Substanzen wie Kalium gekoppelt ist. Somit könnte die verminderte Expression von Kir4.1 die Entstehung eines intrazellulären Ödems begünstigen. In der Tat wurde unter vielen pathologischen Bedingungen wie diabetischer Retinopathie (Pannicke et al. 2006), retinaler Ischämie (Pannicke et al. 2004), Netzhautablösung (Wurm et al. 2006) und endotoxin-induzierter Uveitis (Pannicke et al. 2005) die Entstehung eines intrazellulären Ödems der Müllerzelle in Zusammenhang mit einer verminderten Expression des Kaliumkanals Kir4.1 beobachtet. Die veränderte Expression der Kaliumkanäle in gliotischen Müllerzellen uveitischer Retinae könnte möglicherweise auch bei der ERU zu einer Ansammlung von Kalium in der Müllerzelle führen und folglich zu einem osmotisch bedingten Einstrom von Wasser, der ein intrazelluläres Ödem zur Folge haben würde. Die Auswirkungen einer verminderten Expression von Kir4.1 sollten daher zukünftig weiter untersucht werden. Mit der Etablierung der eqMC-7 Zelllinie, bei welcher auch die Expression von Kir4.1 demonstriert wurde (Abb. 3C, Publikation II), könnten diese Analysen, mittels Blockade von Kir4.1 mit Bariumionen, erfolgen. Es sollte weiterhin erwähnt werden, dass eine eingeschränkte Kaliumpermeabilität der Müllerzellmembran und des damit beeinträchtigten transzellulären Transports dieser Ionen, auch eine Akkumulation von Kalium im Interstitium zur Folge haben kann, welche in einem extrazellulären Ödem resultieren würde (Bringmann et al. 2004). Zudem kann eine erhöhte Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum zur Hyperexzitation von Neuronen führen, die dadurch vermehrt Glutamat freisetzen, welches in hohen Konzentrationen zum einen toxisch wirkt und zum anderen die Entstehung eines extrazellulären Ödems weiter begünstigen würde (Bringmann et al. 2009b; Bringmann et al. 2006). In einer retrospektiven Studie, bei der 582 Menschen mit Uveitis einbezogen wurden, konnte gezeigt werden, dass die Entstehung eines retinalen Ödems als Hauptursache für eine Erblindung oder eingeschränkte

Sehfähigkeit bei dieser Erkrankung anzusehen ist (Rothova et al. 1996). Auch in nachfolgenden Studien konnte bestätigt werden, dass die Entwicklung eines Ödems die häufigste Komplikation einer Uveitis ist und bedeutend zum Verlust der Sehfähigkeit beiträgt (Lardenoye et al. 2006; Thureau 2005). Auch bei der ERU wurde in immunpathologischen Untersuchungen des hinteren Augenabschnittes ein massives Ödem im Bereich des Nervus opticus beschrieben (Deeg et al. 2002a). Außerdem ist das Endstadium der ERU durch den vollständigen Verlust der Sehfähigkeit des betroffenen Auges gekennzeichnet. Daher kommt der Untersuchung von Proteinen, welche den Wassertransport in der Retina vermitteln, eine besondere Bedeutung zu.

Der intraretinale Transport von Wasser wird hauptsächlich über das Membranprotein Aquaporin 4 (AQP4) vermittelt, welches in der Retina ausschließlich von Müllerzellen exprimiert wird (Nagelhus et al. 1998). Dieser transzelluläre Wassertransport ist eng an Ströme osmotisch wirkender Substanzen, insbesondere an die transretinalen Kaliumströme, gekoppelt (Nagelhus et al. 1999; Reichenbach et al. 2007). Den Müllerzellen wird daher eine entscheidende Bedeutung in der Aufrechterhaltung der retinalen Wasserhomöostase beigemessen (Nagelhus et al. 2004). Eine vermehrte Expression von AQP4 im retinalen Membranproteom von einem ERU erkrankten Pferd im Vergleich zu einer Kontrollretina wurde bereits durch vergleichende quantitative Massenspektrometrie im Eingangsexperiment detektiert (Tab. 1, Publikation I) (Hauck et al. 2010). Aufgrund der Funktion von AQP4 und dessen differenzieller Expression bei der ERU, wurde dieser Wasserkanal als sehr interessantes Protein für die weitere Untersuchung der Müllerzellfunktion, insbesondere im Hinblick auf die Entstehung eines Ödems, angesehen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine bildanalytische Quantifizierung dieses Wasserkanals in einer größeren Probenanzahl durchgeführt und damit eine vermehrte Expression von AQP4 in uveitischen Retinae bestätigt (Abb. 3A, Publikation I). Da Membranproteine durch ihre stark hydrophobe Natur eine limitierte Löslichkeit besitzen und deren Abundanz im Gesamtproteom eines Gewebes relativ gering ist, lassen sich diese nur schwer mit gel-basierten Methoden auftrennen und detektieren (Grant and Wu 2007). Auch das Membranprotein AQP4 konnte in der vorliegenden Studie nicht mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot identifiziert und quantifiziert werden. Alternativ hat daher die Bildanalyse von immunhistochemisch gefärbtem AQP4 auf Retinae Anwendung gefunden, die neben der Quantifizierung

außerdem den Vorteil bietet das Expressionsmuster zwischen gesunden und uveitischen Retinae direkt vergleichen zu können. In gesunden equinen Retinae war die Expression von AQP4 ausschließlich entlang der Müllerzelle zu detektieren (Abb. 3A, Publikation I). Die Immunreaktivität in uveitischen Retinae war jedoch nicht mehr in den Stammfortsätzen der Müllerzelle lokalisiert, stattdessen stellte sich diese als kreisförmige Expression in der inneren und äußeren Körnerschicht dar (Abb. 3B, Publikation I). Dieses sich ändernde Expressionsmuster konnte zudem durch die Fluoreszenz-Immunhistochemie bestätigt werden (Abb. 4E, 4F, 4I und 4J, Publikation I) und stellt einen überaus interessanten Befund dar, der in dieser Studie erstmals für die autoimmune Uveitis beschrieben wurde. Insgesamt konnte mit der quantitativen Analyse eine vermehrte Expression von AQP4 bei der autoimmun-medierten Uveitis bestätigt werden (Abb. 3A, Publikation I). Eine Studie an Ratten mit endotoxin-induzierter Uveitis demonstrierte einen initialen Rückgang der AQP4 Expression, die innerhalb von 14 Tagen wieder auf basalem Niveau detektiert werden konnte (Liu et al. 2007). Ebenso wurde eine verminderte Expression von AQP4 in einem Rattenmodell für Netzhautverletzung festgestellt (Dibas et al. 2008). Hingegen stellte sich eine erhöhte Expression von AQP4 in Retinae von Ratten nach Schädigung durch starke Lichtexposition ein (Iandiev et al. 2008). In der vorliegenden Studie wurde im Bezug auf die gesamte Retina eine vermehrte Expression von AQP4 festgestellt, jedoch ließ die Analyse von immunhistochemisch gefärbten Retinae einen deutlichen Verlust der Expression von AQP4 in den Müllerzell-Stammfortsätzen der inneren Retina erkennen. Die Erhöhung hingegen bezieht sich vornehmlich auf die äußere Körnerschicht. Der Verlust von AQP4 in Müllerzell-Stammfortsätzen der inneren Retina könnte möglicherweise im Zusammenhang mit der Entstehung eines Ödems stehen. Unter normalen Bedingungen werden Wasserströme in der inneren Retina über Müllerzellen vermittelt, während die äußere Retina vom retinalen Pigmentepithel dehydriert wird (Bringmann et al. 2004). Daher liegt es Nahe, dass bei einem Verlust der Expression von AQP4 in der inneren Retina die Wasserhomöostase möglicherweise gestört ist, und folglich die Entstehung eines Ödems bei der autoimmun-medierten Uveitis begünstigt wird.

Die Lokalisation von AQP4 in der äußeren Körnerschicht von uveitischen Retinae ist ein interessanter Befund, da bei der ERU durch den vollkommenen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke im Endstadium der Erkrankung ein massives subretinales Ödem entsteht (Deeg et al. 2002a). Die Expression von AQP4 in der äußeren

Körnerschicht könnte somit als Antwort der aktivierten Müllerzellen auf ein entstehendes lokales Ödem in der äußeren Retina von an ERU erkrankten Pferden gewertet werden. Ratten, bei welchen eine Verletzung der Retina durch Exposition mit starkem Licht verursacht wurde, zeigten ebenfalls eine Re-Lokalisation von AQP4 innerhalb der aktivierten Müllerzelle in die Fortsätze der äußeren Körnerschicht und die Entstehung eines lokalen Ödems in diesem Bereich (Iandiev et al. 2008). Zusätzlich wurde bei diesen Ratten eine verminderte Expression von AQP1 in degenerativen Photorezeptoren dokumentiert. AQP1, ein weiteres Mitglied der Aquaporin-Familie das im retinalen Pigmentepithel und in den Photorezeptoren exprimiert wird, vermittelt Wasserströme in der äußeren Retina (Iandiev et al. 2005; Stamer et al. 2003). Um die Osmohomöostase in der äußeren Retina von an ERU erkrankten Pferden besser beurteilen zu können, wäre die Untersuchung des Expressionsmusters von Aquaporin 1 in einer nachfolgenden Studie interessant. In den massenspektrometrischen Untersuchungen gesunder und uveitischer Netzhäute war AQP1 zumindest nicht differenziell exprimiert, so dass hier auch das RPE analysiert werden sollte.

Veränderte Expressionen von Müllerzell-spezifischen Ionen- und Wasserkanalproteinen, welche eine gestörte retinale Kalium- und Wasserhomöostase zur Folge haben, wie es in dieser Arbeit für die autoimmun-medierte Uveitis gezeigt wurde, sind ein häufiger Befund auch bei anderen Retinopathien (Bringmann et al. 2006). Gliazellen scheinen daher maßgeblich an der Entstehung eines Ödems beteiligt zu sein (Bringmann et al. 2004). Ein Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke verstärkt die Ansammlung von Wasser durch den Einstrom von osmotisch wirkenden Serumbestandteilen zusätzlich (Marmor 1999). Daher wird die Regulation der Müllerzell-spezifischen Kalium- und Wasserkanäle in der Retina bereits im Zusammenhang mit therapeutischen Interventionen diskutiert, um die Entstehung eines Ödems zu verhindern oder dieser entgegenzuwirken (Bringmann et al. 2004; Olsen and Sontheimer 2008). In einer Studie wurde bereits gezeigt, dass Guanosin zu einer vermehrten Expression von Kir4.1 in kultivierten Astrozyten führt (Benfenati et al. 2006). Die Faktoren, welche die Expression von Ionen- und Wasserkanälen in der Müllerzelle regulieren sind jedoch weitgehend unbekannt. Daher bedarf es der weiteren intensiven Untersuchung dieser Mechanismen. Durch die Etablierung der equinen Müllerzelllinie eqMC-7 (Publikation II), bei welcher auch die Expression der Membrankanäle Kir4.1 und

---

AQP4 demonstriert werden konnte (Abb. 3C und 3D, Publikation II), ist die Grundvoraussetzung für derartige Untersuchungen jetzt geschaffen.

Ein weiterer interessanter Aspekt bezüglich der vermehrten Expression und Re-Lokalisation von AQP4 bei der ERU, ist dessen Bedeutung in der Zellmigration und dem eventuell damit verbundenem Aufbau einer glialen Narbe (Papadopoulos et al. 2008). Der Übergang einer konservativen Gliose, von welcher angenommen wird, dass sie neuroprotektiv ist, in eine proliferative Form, ist durch die unkontrollierte Migration und Proliferation von Müllerzellen gekennzeichnet. Eine proliferative Gliose führt zur Bildung von glialen Narben, die sich nachteilig auf die Regeneration der Retina auswirken (Bringmann and Reichenbach 2001). In Transwell-Migrations-Versuchen wurde gezeigt, dass die Migration von Astrozyten aus AQP4<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Astrozyten von Wildtyp-Mäusen stark beeinträchtigt ist und somit die Entstehung einer glialen Narbe verzögert ist (Saadoun et al. 2005). Sogar *in vivo* Studien bei der Maus demonstrieren eine eingeschränkte Migration von in das Gehirn implantierten Astrozyten mit unterdrückter AQP4 Expression in Richtung einer Verletzung im Vergleich zu Astrozyten von Wildtyp-Mäusen (Auguste et al. 2007). Migrierende Astrozyten zeigen eine polarisierte Expression von AQP4 an Fortsätzen, welche in Richtung der Migration weisen (Saadoun et al. 2005). Dies sind besonders interessante Befunde im Hinblick auf die vermehrte Expression und geänderte Lokalisation von AQP4 bei der ERU. Zusammengefasst könnte dies auf die Migration von Müllerzellen in den subretinalen Raum und auf die Entwicklung einer massiven Gliose in der autoimmun-medierten Uveitis hindeuten. Migration von Müllerzellfortsätzen über die äußere limitierende Membran in den subretinalen Spalt wurde unter anderem bei Katzen mit experimenteller Netzhautablösung festgestellt (Lewis and Fisher 2000). Außerdem wurde bei Kaninchen, welchen durch Laser-Photokoagulation eine Netzhautverletzung zugefügt wurde, eine Aktivierung und Migration von Müllerzellen in Richtung der Verletzung nachgewiesen (Tackenberg et al. 2009). Die Migration von Müllerzellen in der autoimmun-medierten Uveitis und die Beteiligung von AQP4 sollte weiter erforscht werden, da bisher keine Daten dazu verfügbar sind (Pubmed Recherche Stand 01. April 2011). Die Bedeutung von AQP4 für die Migrationsfähigkeit der Müllerzellen könnte beispielsweise mit einem Transwell-Migrationsassay, unter Verwendung der in dieser Studie etablierten Müllerzelllinie eqMC-7 (Publikation II) nach Transfektion mit AQP4-spezifischer siRNA untersucht werden.

Das Interesse an der Familie der Aquaporine, welche derzeit 13 Mitglieder (AQP0-AQP12) umfasst, ist in letzter Zeit massiv gestiegen. Sowohl deren Expression in verschiedenen Geweben, ihre physiologische Funktion, als auch die Beteiligung in diversen Erkrankungen, wurden in den letzten Jahren intensiv erforscht (Agre 2004; Ishibashi et al. 2009; Verkman 2009; Verkman et al. 2008). Jedoch ist das Wissen über die Expression und Funktion der einzelnen Aquaporine in den verschiedenen Geweben und deren Bedeutung in Krankheiten limitiert. Daher wurde die Expression von AQP5 in der Retina, welche durch die massenspektrometrische Untersuchung des Membranproteoms (Hauck et al. 2010) erstmals auf Proteinebene beschrieben wurde (Pubmed Recherche 01. April 2011), als überaus interessant für eine weitere Charakterisierung in dieser Studie erachtet (Tab. 1, Publikation I). Bei der Untersuchung der Expression von AQP5 im okulären Gewebe von Ratten konnte AQP5 in Cornea, Linse, Iris und Ziliarkörper nachgewiesen werden, die Identifikation in der Retina war jedoch fehlgeschlagen (Patil et al. 1997). Allerdings wurde die mRNA von AQP5 bei einer Untersuchung von humanen und murinen Retinae detektiert (Tenckhoff et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurde deshalb die Aufklärung der AQP5-Expression im retinalen Gewebe des Pferdes für besonders interessant befunden. Das Expressionsmuster dieses Aquaporins in der Retina, welches sich als spezifische Färbung der Müllerzellen darstellt (Abb. 3B, 4G und 4I, Publikation I), wurde erstmalig in dieser Studie gezeigt (Pubmed Recherche 01. April 2011). Darüber hinaus erbrachte der quantitative Vergleich des retinalen Membranproteoms eines gesunden und eines an ERU erkrankten Pferdes eine verminderte Expression von AQP5 in der uveitischen Retina (Hauck et al. 2010) (Tab. 1, Publikation I) und lieferte den ersten Hinweis auf eine Beteiligung von AQP5 in einer retinalen Erkrankung (Pubmed Recherche 01. April 2011). Diese Beteiligung wurde in der vorliegenden Studie mittels bildanalytischer Quantifizierung und immunhistochemischen Untersuchungen in einer größeren Anzahl gesunder und uveitischer Retinae bestätigt (Abb. 3B, 4G, 4H, 4I und 4J, Publikation I). Die Hauptfunktion von Aquaporinen ist der Transport von Wasser über Zellmembranen (Agre et al. 2002). Hinweise auf eine Beteiligung von AQP5 an Wasserbewegungen wurden bereits in mehreren intra- und extraokulären Geweben gefunden. Innerhalb des Auges scheint die Expression von AQP5 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Transparenz der Cornea zu spielen (Thiagarajah and Verkman 2002). Außerdem wurde die Expression in Tränendrüsen in Zusammenhang mit der

Produktion von Tränenflüssigkeit gestellt (Ishida et al. 1997), jedoch erbrachte eine andere Studie einen gegenteiligen Nachweis (Moore et al. 2000). Auch extraokulär wurde AQP5 vor allem in verschiedenen Drüsengeweben nachgewiesen, in welchen seine Expression in Zusammenhang mit Wassertransport über Membranen steht. Diese umfassen beispielsweise Speicheldrüsen (Matsuzaki et al. 1999), Schleimhautdrüsen des Nasopharynx und der oberen Luftwege (Song and Verkman 2001), sowie Duodenaldrüsen (Matsuzaki et al. 2003). Bei AQP5<sup>-/-</sup> Mäusen konnte gezeigt werden, dass AQP5 am Wassertransport über die apikale Membran von Typ I Alveolarepithelzellen beteiligt ist (Ma et al. 2000). Außerdem konnte bei einem weiteren AQP5 Knockout-Modell der Maus eine Verdickung und eine reduzierte Wasserpermeabilität der Cornea festgestellt werden (Thiagarajah and Verkman 2002). Daher lässt die Expression von AQP5 in Müllerzellen der Pferderetina eine Funktion im retinalen Wassertransport vermuten. Die in der vorliegenden Studie gezeigte starke Expression von AQP5 in der inneren plexiformen Schicht und der äußeren Körnerschicht ergänzt das Expressionsmuster von AQP4 in der Müllerzelle (Fig. 4I, Publikation I). Dies könnte darauf hindeuten, dass die retinale Wasserhomöostase von beiden Aquaporinen, jedoch in verschiedenen Bereichen der Retina, reguliert wird. In nachfolgenden Experimenten sollte die Funktion von AQP5 untersucht werden, um dessen Bedeutung in der Müllerzelle weiter charakterisieren zu können. Eine spezifische Blockade des Wasserkanals in kultivierten eqMC-7 Zellen (Publikation II), wie sie beispielsweise bei Kir4.1 Kanälen durch Bariumionen erreicht wird, könnte Hinweise über die Funktion von AQP5 in Müllerzellen liefern. Jedoch ist derzeit kein spezifischer Inhibitor für AQP5 bekannt (Pubmed Recherche Stand 01. April 2011). Daher wäre für eine nähere Charakterisierung des AQP5-Kanals in der Pferderetina zunächst eine Transfektion von eqMC-7 Zellen mit AQP5 spezifischer siRNA angebracht, um eine gezielte Ausschaltung des betreffenden Gens in Müllerzellen zu erreichen.

Der Rückgang der AQP5 Expression in der autoimmun-medierten Uveitis (Abb. 3B, Publikation I) deutet möglicherweise auf eine kausale Beteiligung dieses Proteins in der Pathogenese dieser Erkrankung hin, jedoch könnte die veränderte Expression auch sekundär durch die ERU verursacht sein. In der Lunge von Mäusen, welche nach Induktion einer Entzündung mittels Adenovireninfektion ein massives pulmonales Ödem aufwiesen, wurde eine verminderte Expression von AQP5 im Alveolarepithel festgestellt (Towne et al. 2000). Auch in kultivierten Epithelzellen der

Lunge war nach Inkubation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF $\alpha$  die Expression von AQP5 in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration vermindert (Towne et al. 2001). Bei der ERU konnten nach dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke Makrophagen intraokulär nachgewiesen werden (Zipplies et al. 2010). Diese sezernieren TNF $\alpha$  und könnten somit in Verbindung mit der reduzierten Expression von AQP5 in der uveitischen Retina stehen. Die Auswirkung von TNF $\alpha$  und auch anderen Entzündungsmediatoren auf das Proteom von Müllerzellen sollte weiter untersucht werden, um ein besseres Verständnis der bei der Uveitis ablaufenden Pathogenese-assoziierten Mechanismen zu erlangen. Eine elementare Grundvoraussetzung für dieses Unterfangen wurde in dieser Studie durch die Etablierung der equinen Müllerzelllinie eqMC-7 (Publikation II) geschaffen.

Zusammenfassend wurden in dieser Studie deutliche Hinweise für das Auftreten einer massiven Gliose in der autoimmun-medierten Uveitis gefunden. Die veränderte Expression von Müllerzell-spezifischen Membrankanälen deutet auf eine stark eingeschränkte Kalium- und Wasserhomöostase in der Retina, dem Zielorgan dieser Erkrankung, hin. Das Ausmaß der Gliose hat gravierende Auswirkungen auf die Funktion der Retina und trägt somit zum Verlust der Sehfähigkeit, der bedeutendsten Folge der autoimmun-medierten Uveitis, bei. Die Müllerzelle scheint somit eine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis zu haben.

Die Verifizierung der Expression des Wasserkanals AQP5 in der equinen Retina und dessen Beteiligung an der ERU, demonstriert die Eignung von proteomischen Untersuchungen, insbesondere der Massenspektrometrie, neue Erkenntnisse über Expression und Bedeutung von zuvor unbekannt Proteinen, zu erlangen.

Mit der Etablierung der ersten equinen Müllerzelllinie eqMC-7 steht ein wertvolles Werkzeug für die weitere Untersuchung dieser Zellart zur Verfügung. Insbesondere die Aquaporine und Kaliumkanäle, welche eine weitere spezifische Charakterisierung ihrer Funktion in der equinen Retina verdienen, können in Zukunft mit dieser Zelllinie analysiert werden. Um ein umfassendes Verständnis der Bedeutung der Müllerzelle bei der Pathogenese der autoimmunen Uveitis zu erlangen, wäre die Isolierung und nachfolgende Analyse gliotischer Müllerzellen aus uveitischen Retinae wünschenswert.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) stellt weltweit die häufigste Ursache für eine erworbene Blindheit bei Pferden dar. Diese spontan auftretende, autoimmun-medierte Augenentzündung tritt in der Pferdepopulation mit einer Prävalenz von 10% auf. Die ERU ist zudem das einzige spontane Tiermodell für die autoimmune Uveitis, dessen Erforschung einen wertvollen Beitrag für die humane Uveitisforschung leistet. Ablaufende Pathogenese-assoziierte Vorgänge in der Retina, dem Zielorgan der ERU, sind bisher noch weitgehend ungeklärt, tragen jedoch zu einer fortwährenden Schädigung der retinalen Gewebearchitektur, sowie der physiologischen Funktion der Retina bei. Die Müllerzellen, die retinalen Gliazellen, sind durch ihre besonderen strukturellen und funktionellen Glia-Neuron-Interaktionen von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der retinalen Struktur, sowie der Physiologie. Gliose bezeichnet eine bekannte Reaktion der Müllerzellen auf nahezu alle beschriebenen pathologischen Bedingungen und hat einen fundamentalen Einfluss auf den Verlauf einer Netzhauterkrankung. Die neuroprotektive Wirksamkeit steht dabei den für die Retina schädlichen Auswirkungen der Gliose gegenüber.

Das Ziel dieser Studie war die Verifizierung und nähere Charakterisierung der bei der ERU auftretenden Gliose, um die Bedeutung der Müllerzelle bei der autoimmunen Uveitis zu bemessen und somit ein besseres Verständnis der Pathogenese-assoziierten Vorgänge im Zielorgan dieser Erkrankung zu ermöglichen. Dies wurde durch die Untersuchung der Expression von Müllerzell-spezifischen Membranproteinen, welche maßgeblich an der Regulation der retinalen Ionen- und Wasserhomöostase beteiligt sind, in gesunden im Vergleich zu uveitischen Retinae erzielt. Die Regulation der retinalen Kalium- und Wasserhomöostase ist eine der wichtigsten Müllerzellfunktionen und wird durch die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle Kir2.1 und Kir4.1, sowie dem Wasserkanal Aquaporin 4 (AQP4) bewerkstelligt. Gesunde Pferderetinae zeigten im Gegensatz zu anderen Spezies ein gleichmäßiges Verteilungsmuster von Kir4.1 entlang der Müllerzelle, dessen Expression bei der ERU signifikant vermindert war. Hingegen war die Expression von Kir2.1 in uveitischen Retinae signifikant erhöht, welche auch ein verändertes Expressionsmuster für Kir2.1 von Müllerzellfortsätzen hin zu den Zellkörpern der inneren Körnerschicht aufwies. Diese Befunde deuten auf eine gestörte

Kaliumpermeabilität der Müllerzellmembran hin, die eine Beeinträchtigung der retinalen Kaliumhomöostase, sowie weiterer Funktionen der Müllerzelle zur Folge haben könnte. AQP4 war signifikant erhöht exprimiert und zeigte eine massive Re-Lokalisation in uveitischen Retinae im Vergleich zu Kontrollen. Während gesunde Retinae eine AQP4 Expression vor allem in Stammfortsätzen der Müllerzelle aufwiesen, wurde ein kreisförmiges Expressionsmuster in der äußeren Körnerschicht von uveitischen Retinae detektiert. Dies könnte möglicherweise in Verbindung mit der Entstehung eines retinalen Ödems stehen, einer der Hauptursachen für den Verlust der Sehfähigkeit bei Uveitis. In der vorliegenden Studie wurde zudem das Verteilungsmuster eines weiteren Mitglieds der Aquaporin-Familie (AQP5) charakterisiert und erstmalig dessen Expression in der Müllerzelle beschrieben. Außerdem wurde eine signifikant verminderte Expression bei der autoimmun-medierten Uveitis gefunden und damit erstmals eine Beteiligung dieses Membranproteins bei einer retinalen Erkrankung dokumentiert.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Müllerzelle von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der ERU ist, da die auftretende Gliose schädliche Auswirkungen auf die physiologische Funktion der Retina zu haben scheint. Weitere funktionelle Untersuchungen der Müllerzelle sind zukünftig notwendig, um ein besseres Verständnis der Physiologie der Müllerzelle und ihrer Beeinträchtigung bei der ERU zu erlangen. Durch die Etablierung der ersten equinen Müllerzelllinie eqMC-7 wurde mit dieser Studie die Grundvoraussetzung für dieses Vorhaben geschaffen.

## 7 SUMMARY

### **The role of Müller cells in the pathogenesis of equine recurrent uveitis and establishment of an equine Müller cell line**

Equine recurrent uveitis (ERU) is the most common cause of blindness in horses worldwide. This spontaneous, autoimmune-mediated inflammation of the inner eye occurs with a prevalence of 10% in the equine population. Since ERU represents the only spontaneous animal model for human autoimmune uveitis, investigating ERU pathogenesis contributes substantially to research in the field of human uveitis.

Pathogenesis-related mechanisms in the retina, the target tissue of ERU, are largely unknown. However, they contribute to perpetual detriment of the retinal architecture and physiological function. Retinal Müller glial cells are of particular importance for the maintenance of retinal structure and physiology due to their special structural and functional neuron-glia-interactions. Gliosis describes a well-established response of Müller cells to virtually every known pathological condition and has a significant impact on the course of retinal diseases. On this occasion the neuroprotective responses of gliosis oppose its detrimental effects on the retina.

The aim of this study was the verification and characterization of gliosis in ERU to assess the importance of Müller cells in autoimmune uveitis and to gain a better understanding of the pathogenesis-related mechanisms occurring in the target tissue of the disease. This was achieved by investigating Müller cell specific membrane proteins involved in the regulation of retinal potassium and water homeostasis in healthy compared to uveitic retinas. The regulation of retinal potassium and water homeostasis is one of the most important Müller cell functions and is accomplished by inwardly rectifying potassium channels Kir2.1 and Kir4.1, as well as the water channel aquaporin 4 (AQP4). In contrast to other species, healthy horse retinas presented with an even distribution of Kir4.1 along the Müller cell and a significant downregulation in ERU was observed. The expression of Kir2.1 was significantly upregulated in ERU diseased retinas and showed an expression pattern shift from Müller cell processes in healthy retinas to cell somata of the inner nuclear layer in ERU. These findings indicate a reduced potassium permeability of the Müller cell membrane that might cause an impaired retinal potassium homeostasis as well as a disturbance of other Müller cell functions. AQP4 was expressed at a significantly higher level and showed a severe re-localisation in uveitic retinas compared to

controls. Whereas healthy retinas demonstrated an expression of AQP4 mainly in Müller cell trunks, a circular expression pattern in the outer nuclear layer of uveitic retinas was detected. This might coincide with the development of a retinal edema, the main cause of blindness in uveitis. In the present study, the expression pattern of a further member of the aquaporin family (AQP5) was characterized in the equine retina and an expression of AQP5 in Müller cells was observed for the first time. Furthermore, a significant downregulation of AQP5 in autoimmune uveitis was found, which represents the first report of an involvement of this membrane protein in a retinal disease.

The results of this study indicate that Müller cells are of decisive importance for the pathogenesis of ERU, since gliosis seems to contribute to detrimental effects on the physiological function of the retina. Future functional investigations of Müller cells are required to gain a better understanding of Müller cell physiology and its impairment in ERU. A prerequisite for this venture was accomplished by the establishment of the first equine Müller cell line eqMC-7 in the present study.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agre P. 2004. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 43:4278-90.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. 2002. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542:3-16.
- Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, Kellner R, Kubicek M, Lottspeich F, Maser E, Mewes HW, Meyer HE, Mullner S, Mutter W, Neumaier M, Nollau P, Nothwang HG, Ponten F, Radbruch A, Reinert K, Rothe G, Stockinger H, Tarnok A, Taussig MJ, Thiel A, Thiery J, Ueffing M, Valet G, Vandekerckhove J, Wagener C, Wagner O, Schmitz G. 2009. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry A* 75:816-32.
- Arinaminpathy Y, Khurana E, Engelman DM, Gerstein MB. 2009. Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets. *Drug Discov Today* 14:1130-5.
- Auguste KI, Jin S, Uchida K, Yan D, Manley GT, Papadopoulos MC, Verkman AS. 2007. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J* 21:108-16.
- Banker G, Goslin K. 1988. Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336:185-6.
- Barnett NL, Pow DV. 2000. Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:585-91.
- Beck M, Claassen M, Aebersold R. 2011. Comprehensive proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 22:3-8.
- Becker MD, Adamus G, Davey MP, Rosenbaum JT. 2000. The role of T cells in autoimmune uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 8:93-100.
- Benfenati V, Caprini M, Nobile M, Rapisarda C, Ferroni S. 2006. Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 98:430-45.
- Bignami A, Dahl D. 1979. The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res* 28:63-9.
- Borman S, Russell H, Siuzdak G. 2003. A mass spectrometry timeline. *Today's Chemist* 13:47-49.
- Brew H, Attwell D. 1987. Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* 327:707-9.
- Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Kodal H, Faude F, Reichelt W, Reichenbach A. 2000. Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Muller cells. *Glia* 29:35-44.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. 2009a. Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 28:423-51.
- Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, Grosche J, Wiedemann P, Albrecht J, Reichenbach A. 2009b. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54:143-60.

- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397-424.
- Bringmann A, Reichenbach A. 2001. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 6:E72-92.
- Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. 2004. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res* 36:241-9.
- Butler GS, Dean RA, Morrison CJ, Overall CM. 2010. Identification of cellular MMP substrates using quantitative proteomics: isotope-coded affinity tags (ICAT) and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ). *Methods Mol Biol* 622:451-70.
- Butterfield DA. 2004. Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 1000:1-7.
- Cairns L, Ciro M, Minuzzo M, Morle F, Starck J, Ottolenghi S, Ronchi A. 2003. Induction of globin mRNA expression by interleukin-3 in a stem cell factor-dependent SV-40 T-antigen-immortalized multipotent hematopoietic cell line. *J Cell Physiol* 195:38-49.
- Canas B, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Camafeita E, Calvo E. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4:295-320.
- Caspi RR. 2003. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15:Unit 15 6.
- Caspi RR. 2010. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* 120:3073-83.
- Caspi RR, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ. 1990. The mouse as a model of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Curr Eye Res* 9 Suppl:169-74.
- Caspi RR, Roberge FG. 1989. Glial cells as suppressor cells: characterization of the inhibitory function. *J Autoimmun* 2:709-22.
- Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, Lando Z, Nussenblatt RB. 1988. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 140:1490-5.
- Caspi RR, Silver PB, Luger D, Tang J, Cortes LM, Pennesi G, Mattapallil MJ, Chan CC. 2008. Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* 40:169-74.
- Chan CC, Roberge FG, Ni M, Zhang W, Nussenblatt RB. 1991. Injury of Muller cells increases the incidence of experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Immunol Immunopathol* 59:201-7.
- Chen G, Pramanik BN. 2008. LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends. *Expert Rev Proteomics* 5:435-44.
- Cook CS, Pferiffer RL, Harling DE. 1983. Equine recurrent uveitis. *Equine Vet J* Suppl 15:57-60.
- Cotter RJ, Ilchenko S, Wang D, Gundry R. 2005. Tandem Time-of-Flight (TOF/TOF) Mass Spectrometry and Proteomics. *J Mass Spectrom Soc Jpn* 53:7-17.
- Cox J, Mann M. 2007. Is proteomics the new genomics? *Cell* 130:395-8.
- Das SR, Bhardwaj N, Kjeldbye H, Gouras P. 1992. Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol. *Biochem J* 285 ( Pt 3):907-13.
- de Kozak Y, Sakai J, Thillaye B, Faure JP. 1981. S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. *Curr Eye Res* 1:327-37.
- de Smet MD, Bitar G, Mainigi S, Nussenblatt RB. 2001. Human S-antigen determinant recognition in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:3233-8.

- Deeg CA. 2008. Ocular immunology in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 11 Suppl 1:61-5.
- Deeg CA, Altmann F, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, 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* 7:1540-8.
- Deeg CA, Amann B, Raith AJ, Kaspers B. 2006a. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:652-6.
- Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. 2002a. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 75:127-33.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Kremmer E, Stangassinger M, Ueffing M. 2007b. Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol* 44:3291-6.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, Schmalzl T, Stangassinger M, Ueffing M. 2008. Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* 40:151-3.
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thurau SR, Wollanke B, Wildner G. 2001. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:393-8.
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, Goebel TW, Olazabal U, Gerhards H, Reese S, Stangassinger M, Kaspers B, Ueffing M. 2006b. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5:1462-70.
- Deeg CA, Raith AJ, Amann B, Crabb JW, Thurau SR, Hauck SM, Ueffing M, Wildner G, Stangassinger M. 2007c. CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* 2007:39245.
- Deeg CA, Reese S, Gerhards H, Wildner G, Kaspers B. 2004. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2286-92.
- Deeg CA, Thurau SR, Gerhards H, Ehrenhofer M, Wildner G, Kaspers B. 2002b. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* 32:2598-606.
- Derouiche A, Rauen T. 1995. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 42:131-43.
- Dibas A, Yang MH, He S, Bobich J, Yorio T. 2008. Changes in ocular aquaporin-4 (AQP4) expression following retinal injury. *Mol Vis* 14:1770-83.
- Dicou E, Nerriere V, Naud MC, de Kozak Y. 1994. NGF involvement in ocular inflammation: secretion by rat resident retinal cells. *Neuroreport* 6:26-8.
- Diedrichs-Mohring M, Hoffmann C, Wildner G. 2008. Antigen-dependent monophasic or recurrent autoimmune uveitis in rats. *Int Immunol* 20:365-74.
- Dongre AR, Eng JK, Yates JR, 3rd. 1997. Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *Trends Biotechnol* 15:418-25.
- Dreher Z, Robinson SR, Distler C. 1992. Muller cells in vascular and avascular retinae: a survey of seven mammals. *J Comp Neurol* 323:59-80.
- Ehinger B. 1977. Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp Eye Res* 25:221-34.

- Ehrenhofer MC, Deeg CA, Reese S, Liebich HG, Stangassinger M, Kaspers B. 2002. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol* 5:39-47.
- Eichler W, Yafai Y, Keller T, Wiedemann P, Reichenbach A. 2004. PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 299:68-78.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246:64-71.
- Festing S, Wilkinson R. 2007. The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. *EMBO Rep* 8:526-30.
- Fiehn C, Zierhut M, Becker M. 2003. Differenzialdiagnose der Uveitis. *Deutsches Ärzteblatt Jg 100* 39:2514-2522.
- Forrester JV. 1991. Uveitis: pathogenesis. *Lancet* 338:1498-501.
- Francke M, Faude F, Pannicke T, Bringmann A, Eckstein P, Reichelt W, Wiedemann P, Reichenbach A. 2001. Electrophysiology of rabbit Muller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1072-9.
- Francke M, Faude F, Pannicke T, Uckermann O, Weick M, Wolburg H, Wiedemann P, Reichenbach A, Uhlmann S, Bringmann A. 2005. Glial cell-mediated spread of retinal degeneration during detachment: a hypothesis based upon studies in rabbits. *Vision Res* 45:2256-67.
- Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J. 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8287-92.
- Geiger T, Cox J, Mann M. 2010. Proteomics on an Orbitrap benchtop mass spectrometer using all-ion fragmentation. *Mol Cell Proteomics* 9:2252-61.
- Gery I, Mochizuki M, Nussenblatt RB. 1986a. Retinal-specific antigens and immunopathogenic processes they provoke. *Prog Retinal Res* 5:75-109.
- Gery I, Streilein JW. 1994. Autoimmunity in the eye and its regulation. *Curr Opin Immunol* 6:938-45.
- Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, Chader GJ. 1986b. Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:1296-300.
- Gilger BC. 2010. Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA. *Equine Vet J Suppl*:57-61.
- Gilger BC, Malok E, Cutter KV, Stewart T, Horohov DW, Allen JB. 1999. Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* 71:17-28.
- Gilger BC, Michau TM. 2004. Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* 20:417-27, vii.
- Grant KJ, Wu CC. 2007. Advances in neuromembrane proteomics: efforts towards a comprehensive analysis of membrane proteins in the brain. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6:59-69.
- Grosche J, Hartig W, Reichenbach A. 1995. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Muller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci Lett* 185:119-22.
- Grossmann J, Roschitzki B, Panse C, Fortes C, Barkow-Oesterreicher S, Rutishauser D, Schlapbach R. 2010. Implementation and evaluation of relative and absolute quantification in shotgun proteomics with label-free methods. *J Proteomics* 73:1740-6.

- Guerin-Dubiard C, Pasco M, Molle D, Desert C, Croguennec T, Nau F. 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *J Agric Food Chem* 54:3901-10.
- Hamacher M, Meyer HE. 2005. HUPO Brain Proteome Project: aims and needs in proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2:1-3.
- Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gilden DH. 2004. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 10:245-60.
- Hammer M, Roggan A, Schweitzer D, Muller G. 1995. Optical properties of ocular fundus tissues--an in vitro study using the double-integrating-sphere technique and inverse Monte Carlo simulation. *Phys Med Biol* 40:963-78.
- Hauck SM, Dietter J, Kramer RL, Hofmaier F, Zipplies JK, Amann B, Feuchtinger A, Deeg CA, Ueffing M. 2010. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Gerhards H, Ueffing M, Deeg CA. 2007. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 6:2121-31.
- Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Healy L, Hunt C, Young L, Stacey G. 2005. The UK Stem Cell Bank: its role as a public research resource centre providing access to well-characterised seed stocks of human stem cell lines. *Adv Drug Deliv Rev* 57:1981-8.
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5011-5.
- Hines MT. 1984. Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 6:501-12.
- Hirose S, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Nussenblatt RB, Chader GJ, Gery I. 1987. Uveitis induced in primates by IRBP: humoral and cellular immune responses. *Exp Eye Res* 45:695-702.
- Hirrlinger PG, Ulbricht E, Iandiev I, Reichenbach A, Pannicke T. 2010. Alterations in protein expression and membrane properties during Muller cell gliosis in a murine model of transient retinal ischemia. *Neurosci Lett* 472:73-8.
- Hofmaier F, Hauck SM, Amann B, Degroote RL, Deeg CA. 2011. Changes in matrix metalloproteinase network in spontaneous autoimmune uveitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Hori J, Vega JL, Masli S. 2010. Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye. *Ocul Immunol Inflamm* 18:325-33.
- Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. 1998. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 4:781-5.
- Iandiev I, Pannicke T, Reichel MB, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. 2005. Expression of aquaporin-1 immunoreactivity by photoreceptor cells in the mouse retina. *Neurosci Lett* 388:96-9.
- Iandiev I, Tenckhoff S, Pannicke T, Biedermann B, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. 2006a. Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 396:97-101.
- Iandiev I, Uckermann O, Pannicke T, Wurm A, Tenckhoff S, Pietsch UC, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Uhlmann S. 2006b. Glial cell

- reactivity in a porcine model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2161-71.
- Iandiev I, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Grimm C, Reme CE, Reichenbach A, Pannicke T, Bringmann A. 2008. Muller cell response to blue light injury of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3559-67.
- Ishibashi K, Hara S, Kondo S. 2009. Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol* 13:107-17.
- Ishida N, Hirai SI, Mita S. 1997. Immunolocalization of aquaporin homologs in mouse lacrimal glands. *Biochem Biophys Res Commun* 238:891-5.
- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y. 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17:7725-35.
- Joly S, Pernet V, Chemtob S, Di Polo A, Lachapelle P. 2007. Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2311-20.
- Kalsow CM, Dwyer AE. 1998. Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 6:239-51.
- Kalsow CM, Dwyer AE, Smith AW, Nifong TP. 1993. Pinealitis accompanying equine recurrent uveitis. *Br J Ophthalmol* 77:46-8.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60:2299-301.
- Kim MK, Chan CC, Belfort R, Jr., Farah M, Burnier MP, Nussenblatt RB, Kuwabara T, Palestine AG. 1987. Histopathologic and immunohistopathologic features of subretinal fibrosis and uveitis syndrome. *Am J Ophthalmol* 104:15-23.
- Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A. 2002. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39:292-303.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20:5733-40.
- Kuwabara T, Cogan DG. 1961. Retinal glycogen. *Arch Ophthalmol* 66:680-8.
- Lam TC, Chun RK, Li KK, To CH. 2008. Application of proteomic technology in eye research: a mini review. *Clin Exp Optom* 91:23-33.
- Lardenoye CW, van Kooij B, Rothova A. 2006. Impact of macular edema on visual acuity in uveitis. *Ophthalmology* 113:1446-9.
- Levander F, James P. 2005. Automated protein identification by the combination of MALDI MS and MS/MS spectra from different instruments. *J Proteome Res* 4:71-4.
- Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. 1989. Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res* 49:93-111.
- Lewis GP, Fisher SK. 2000. Muller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1542-5.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092-100.
- Lilley KS, Friedman DB. 2004. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* 1:401-9.

- Lin RY, Vera JC, Chaganti RS, Golde DW. 1998. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem* 273:28959-65.
- Linser P, Moscona AA. 1979. Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Muller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6476-80.
- Liu XQ, Kobayashi H, Jin ZB, Wada A, Nao IN. 2007. Differential expression of Kir4.1 and aquaporin 4 in the retina from endotoxin-induced uveitis rat. *Mol Vis* 13:309-17.
- Lu YB, Franze K, Seifert G, Steinhauser C, Kirchhoff F, Wolburg H, Guck J, Janmey P, Wei EQ, Kas J, Reichenbach A. 2006. Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17759-64.
- Lux HD. 1974. Fast recording ion specific microelectrodes: their use in pharmacological studies in the CNS. *Neuropharmacology* 13:509-17.
- Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. 2000. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest* 105:93-100.
- Macher BA, Yen TY. 2007. Proteins at membrane surfaces-a review of approaches. *Mol Biosyst* 3:705-13.
- Makarov A. 2000. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* 72:1156-62.
- Mann K. 2007. The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7:3558-68.
- Mann K, Mann M. 2011. In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos. *Proteome Sci* 9:7.
- Marmor MF. 1999. Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol* 97:239-49.
- Massey SC, Miller RF. 1987. Excitatory amino acid receptors of rod- and cone-driven horizontal cells in the rabbit retina. *J Neurophysiol* 57:645-59.
- Massey SC, Miller RF. 1990. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol* 63:16-30.
- Matsui K, Hosoi N, Tachibana M. 1999. Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci* 19:6755-66.
- Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. 1999. Aquaporin-5 (AQP5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation. *Cell Tissue Res* 295:513-21.
- Matsuzaki T, Tajika Y, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. 2003. Immunolocalization of the water channel, aquaporin-5 (AQP5), in the rat digestive system. *Arch Histol Cytol* 66:307-15.
- Medzihradzky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL. 2000. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* 72:552-8.
- Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Yauch RL, Neville KL, Katz-Levy Y, Carrizosa A, Kim BS. 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 3:1133-6.
- Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C, Nussenblatt RB, Gery I. 1985. Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:1-9.
- Moore M, Ma T, Yang B, Verkman AS. 2000. Tear secretion by lacrimal glands in transgenic mice lacking water channels AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5. *Exp Eye Res* 70:557-62.

- Morimoto T, Miyoshi T, Matsuda S, Tano Y, Fujikado T, Fukuda Y. 2005. Transcorneal electrical stimulation rescues axotomized retinal ganglion cells by activating endogenous retinal IGF-1 system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2147-55.
- Motulsky E, Koch P, Janssens S, Lienart M, Vanbellinghen AM, Bolaky N, Chan CC, Caspers L, Martin-Martinez MD, Xu H, Delporte C, Willermain F. 2010. Aquaporin expression in blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis. *Mol Vis* 16:602-10.
- Müller H. 1851. Zur Histologie der Netzhaut. *Zeitschrift für Wissenschaft und Zoologie* 3:234-237.
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26:47-54.
- Nagelhus EA, Mathiesen TM, Ottersen OP. 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129:905-13.
- Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P, Ottersen OP. 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18:2506-19.
- Newman E, Reichenbach A. 1996. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-12.
- Newman EA. 1984. Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature* 309:155-7.
- Newman EA. 1985. Membrane physiology of retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 5:2225-39.
- Newman EA. 1987. Distribution of potassium conductance in mammalian Muller (glial) cells: a comparative study. *J Neurosci* 7:2423-32.
- Newman EA. 1993. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 13:3333-45.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL. 1984. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K<sup>+</sup> siphoning. *Science* 225:1174-5.
- Nussenblatt RB. 1990. The natural history of uveitis. *Int Ophthalmol* 14:303-8.
- Nussenblatt RB, Kuwabara T, de Monasterio FM, Wacker WB. 1981. S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol* 99:1090-2.
- Olsen JV, Schwartz JC, Griep-Raming J, Nielsen ML, Damoc E, Denisov E, Lange O, Remes P, Taylor D, Splendore M, Wouters ER, Senko M, Makarov A, Mann M, Horning S. 2009. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol Cell Proteomics* 8:2759-69.
- Olsen ML, Sontheimer H. 2008. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem* 107:589-601.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.
- Otori Y, Shimada S, Tanaka K, Ishimoto I, Tano Y, Tohyama M. 1994. Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 27:310-4.
- Paglia DT, Miller PE, Dubielzig RR. 2004. James Wardrop and equine recurrent uveitis. *Arch Ophthalmol* 122:1218-23.

- Palestine AG, Mc Allister C, Carter C, Keenan AM, Vistica B, Gery I, Davey R, Nussenblatt R. 1986. Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:611-5.
- Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. 2001. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411:42-3.
- Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O, Biedermann B, Kutzera F, Wiedemann P, Wolburg H, Reichenbach A, Bringmann A. 2004. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci* 26:493-502.
- Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, Reichenbach A, Wiedemann P, Hammes HP, Bringmann A. 2006. Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* 55:633-9.
- Pannicke T, Stabel J, Heinemann U, Reichelt W. 1994. alpha-Aminoadipic acid blocks the Na(+)-dependent glutamate transport into acutely isolated Muller glial cells from guinea pig retina. *Pflugers Arch* 429:140-2.
- Pannicke T, Uckermann O, Iandiev I, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. 2005. Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Muller glial cells. *J Neuroimmunol* 161:145-54.
- Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. 2008. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch* 456:693-700.
- Pastwa E, Somiari SB, Czyz M, Somiari RI. 2007. Proteomics in human cancer research. *Proteomics Clin Appl* 1:4-17.
- Patil RV, Saito I, Yang X, Wax MB. 1997. Expression of aquaporins in the rat ocular tissue. *Exp Eye Res* 64:203-9.
- Perez-Escuredo J, Garcia Martinez J, Garcia-Inclan C, Vivanco B, Costales M, Alvarez Marcos C, Llorente JL, Hermsen MA. 2011. Establishment and genetic characterization of an immortal tumor cell line derived from intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Cell Oncol (Dordr)* 34:23-31.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-67.
- Pfeiffer-Guglielmi B, Francke M, Reichenbach A, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B. 2005. Glycogen phosphorylase isozyme pattern in mammalian retinal Muller (glial) cells and in astrocytes of retina and optic nerve. *Glia* 49:84-95.
- Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M. 1995. Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15:5179-91.
- Poitry-Yamate CL, Tsacopoulos M. 1992. Glucose metabolism in freshly isolated Muller glial cells from a mammalian retina. *J Comp Neurol* 320:257-66.
- Pow DV, Crook DK. 1996. Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience* 70:295-302.
- Prendergast RA, Iliff CE, Coskuncan NM, Caspi RR, Sartani G, Tarrant TK, Luty GA, McLeod DS. 1998. T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:754-62.
- Purcell AW, Gorman JJ. 2004. Immunoproteomics: Mass spectrometry-based methods to study the targets of the immune response. *Mol Cell Proteomics* 3:193-208.

- Puro DG, Stuenkel EL. 1995. Thrombin-induced inhibition of potassium currents in human retinal glial (Muller) cells. *J Physiol* 485 ( Pt 2):337-48.
- Rao NA, Wacker WB, Marak GE, Jr. 1979. Experimental allergic uveitis: clinicopathologic features associated with varying doses of S antigen. *Arch Ophthalmol* 97:1954-8.
- Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M. 1998. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* 291:19-31.
- Rebhun WC. 1979. Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J Am Vet Med Assoc* 175:803-8.
- Reichelt W, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Faude F. 1997. Comparison between functional characteristics of healthy and pathological human retinal Muller glial cells. *Surv Ophthalmol* 42 Suppl 1:S105-17.
- Reichenbach A, Fuchs U, Kasper M, el-Hifnawi E, Eckstein AK. 1995. Hepatic retinopathy: morphological features of retinal glial (Muller) cells accompanying hepatic failure. *Acta Neuropathol* 90:273-81.
- Reichenbach A, Hagen E, Schippel K, Eberhardt W. 1988. Quantitative electron microscopy of rabbit Muller (glial) cells in dependence on retinal topography. *Z Mikrosk Anat Forsch* 102:721-55.
- Reichenbach A, Henke A, Eberhardt W, Reichelt W, Dettmer D. 1992. K<sup>+</sup> ion regulation in retina. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S239-47.
- Reichenbach A, Schneider H, Leibnitz L, Reichelt W, Schaaf P, Schumann R. 1989. The structure of rabbit retinal Muller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat Embryol (Berl)* 180:71-9.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D, Hertz L. 1993. What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *J Chem Neuroanat* 6:201-13.
- Reichenbach A, Wohlrab F. 1986. Morphometric parameters of Muller (glial) cells dependent on their topographic localization in the nonmyelinated part of the rabbit retina. A consideration of functional aspects of radial glia. *J Neurocytol* 15:451-9.
- Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. 2007. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245:627-36.
- Riepe RE, Norenburg MD. 1977. Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268:654-5.
- Romeike A, Brugmann M, Drommer W. 1998. Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol* 35:515-26.
- Rothova A, Suttrop-van Schulten MS, Frits Treffers W, Kijlstra A. 1996. Causes and frequency of blindness in patients with intraocular inflammatory disease. *Br J Ophthalmol* 80:332-6.
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Watanabe H, Yan D, Manley GT, Verkman AS. 2005. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* 118:5691-8.
- Sarthy VP, Pignataro L, Pannicke T, Weick M, Reichenbach A, Harada T, Tanaka K, Marc R. 2005. Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia* 49:184-96.
- Schaeffer WI. 1990. Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics. Tissue Culture Association Terminology Committee. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:97-101.

- Schnitzer J. 1988. Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia* 1:74-89.
- Schutte M, Werner P. 1998. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 246:53-6.
- Schwink KL. 1992. Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 8:557-74.
- Scigelova M, Makarov A. 2006. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2:16-21.
- Seki M, Tanaka T, Sakai Y, Fukuchi T, Abe H, Nawa H, Takei N. 2005. Muller Cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Muller cells. *Neurochem Res* 30:1163-70.
- Shevchenko A, Loboda A, Ens W, Standing KG. 2000. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Anal Chem* 72:2132-41.
- Song Y, Verkman AS. 2001. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands. *J Biol Chem* 276:41288-92.
- Sparre T, Bergholdt R, Nerup J, Pociot F. 2003. Application of genomics and proteomics in Type 1 diabetes pathogenesis research. *Expert Rev Mol Diagn* 3:743-57.
- Spieß BM. 1997. [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 139:126-33.
- Spieß BM. 2010. Equine recurrent uveitis: the European viewpoint. *Equine Vet J* Suppl:50-6.
- Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS. 2003. Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2803-8.
- Steinberg RH, Oakley B, 2nd, Niemeyer G. 1980. Light-evoked changes in [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> in retina of intact cat eye. *J Neurophysiol* 44:897-921.
- Stevens TJ, Arkin IT. 2000. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* 39:417-20.
- Streilein JW. 1990. Anterior chamber associated immune deviation: the privilege of immunity in the eye. *Surv Ophthalmol* 35:67-73.
- Tackenberg MA, Tucker BA, Swift JS, Jiang C, Redenti S, Greenberg KP, Flannery JG, Reichenbach A, Young MJ. 2009. Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Mol Vis* 15:1886-96.
- Takasaki I, Takarada S, Fukuchi M, Yasuda M, Tsuda M, Tabuchi Y. 2007. Identification of genetic networks involved in the cell growth arrest and differentiation of a rat astrocyte cell line RCG-12. *J Cell Biochem* 102:1472-85.
- Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S, et al. 1995. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem* 270:16339-46.
- Taylor SR, Isa H, Joshi L, Lightman S. 2010. New developments in corticosteroid therapy for uveitis. *Ophthalmologica* 224 Suppl 1:46-53.
- Tenckhoff S, Hollborn M, Kohlen L, Wolf S, Wiedemann P, Bringmann A. 2005. Diversity of aquaporin mRNA expressed by rat and human retinas. *Neuroreport* 16:53-6.
- Tezel G, Wax MB. 2000. Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20:8693-700.

- Thiagarajah JR, Verkman AS. 2002. Aquaporin deletion in mice reduces corneal water permeability and delays restoration of transparency after swelling. *J Biol Chem* 277:19139-44.
- Thoreson WB, Witkovsky P. 1999. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 18:765-810.
- Thurau SR. 2005. [Cystoid macular edema in uveitis]. *Ophthalmologe* 102:485-90.
- Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J. 1993. The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 55:291-301.
- Towne JE, Harrod KS, Krane CM, Menon AG. 2000. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:34-44.
- Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. 2001. Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J Biol Chem* 276:18657-64.
- Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, MacLeish PR, Poitry S. 1998. Trafficking of molecules and metabolic signals in the retina. *Prog Retin Eye Res* 17:429-42.
- Uga S, Smelser. 1973. Comparative study of the fine structure of retinal Muller cells in various vertebrates. *Invest Ophthalmol* 12:434-48.
- Ulbricht E, Pannicke T, Hollborn M, Raap M, Goczalik I, Iandiev I, Hartig W, Uhlmann S, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A, Francke M. 2008. Proliferative gliosis causes mislocation and inactivation of inwardly rectifying K(+) (Kir) channels in rabbit retinal glial cells. *Exp Eye Res* 86:305-13.
- Vanderlugt CJ, Miller SD. 1996. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 8:831-6.
- Verkman AS. 2009. Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol*:359-81.
- Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. 2008. Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res* 27:420-33.
- Virchow R. 1858. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische Gewebelehre. Zwanzig Vorlesungen gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institut zu Berlin, August Hirschwald.
- Vogel G. 2002. British science. Pioneering stem cell bank will soon be open for deposits. *Science* 297:1784.
- Vogt SD, Barnum SR, Curcio CA, Read RW. 2006. Distribution of complement anaphylatoxin receptors and membrane-bound regulators in normal human retina. *Exp Eye Res* 83:834-40.
- Vos JJ, Bouman MA. 1964. Contribution of the Retina to Entoptic Scatter. *J Opt Soc Am* 54:95-100.
- Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA, Jr., Organisciak DT. 1977. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 119:1949-58.
- Walsh N, Valter K, Stone J. 2001. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Exp Eye Res* 72:495-501.
- Wiener MC, Sachs JR, Deyanova EG, Yates NA. 2004. Differential mass spectrometry: a label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures. *Anal Chem* 76:6085-96.
- Wildner G, Diedrichs-Mohring M, Thurau SR. 2008. Rat models of autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* 40:141-4.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. 1996a. Progress with proteome projects: why all proteins

- expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:19-50.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Williams KL, Hochstrasser DF. 1996b. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* 17:830-8.
- Wilson KE, Ryan MM, Prime JE, Pashby DP, Orange PR, O'Beirne G, Whateley JG, Bahn S, Morris CM. 2004. Functional genomics and proteomics: application in neurosciences. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:529-38.
- Wilson RB, Kunchithapautham K, Rohrer B. 2007. Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2877-86.
- Winefield RD, Williams TD, Himes RH. 2009. A label-free mass spectrometry method for the quantification of protein isotypes. *Anal Biochem* 395:217-23.
- Winkler BS, Arnold MJ, Brassell MA, Puro DG. 2000. Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3183-90.
- Witkovsky P, Stone S, Ripps H. 1985. Pharmacological modification of the light-induced responses of Muller (glial) cells in the amphibian retina. *Brain Res* 328:111-20.
- Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G. 2004. Muller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 47:109-19.
- Wu CC, Yates JR, 3rd. 2003. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol* 21:262-7.
- Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Buhner E, Pietsch UC, Reichenbach A, Wiedemann P, Uhlmann S, Bringmann A. 2006. Changes in membrane conductance play a pathogenic role in osmotic glial cell swelling in detached retinas. *Am J Pathol* 169:1990-8.
- Yates JR, 3rd. 2004. Mass spectral analysis in proteomics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:297-316.
- Yu DY, Cringle SJ. 2001. Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 20:175-208.
- Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K, Ma JX. 2006. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 37:1-12.
- Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H. 1998. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* 279:1344-7.
- Zipplies JK, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Ueffing M, Deeg CA. 2009. Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 8:992-8.
- Zipplies JK, Kirschfink M, Amann B, Hauck SM, Stangassinger M, Deeg CA. 2010. Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology*.
- Zongaro S, de Stanchina E, Colombo T, D'Incalci M, Giulotto E, Mondello C. 2005. Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line. *Cancer Res* 65:11411-8.

## **DANKSAGUNG**

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger möchte ich mich herzlich für den am Institut für Tierphysiologie zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die sehr guten Arbeitsbedingungen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Cornelia A. Deeg für die Überlassung des interessanten Themas und für die ausgezeichnete fachliche Betreuung dieser Arbeit. Sie stand mir jederzeit mit wertvollen Anregungen zur Seite und unterstützte mich stets durch ihre Bereitschaft Ergebnisse und Hypothesen zu diskutieren. Durch ihr hohes persönliches Engagement begeisterte sie mich für das wissenschaftliche Arbeiten und ermöglichte mir die aktive Teilnahme an Tagungen und erste Erfahrungen auf dem Gebiet des Publizierens.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Stefanie Hauck für die großartige Unterstützung beim Verfassen der Publikationen, für die Möglichkeit im Helmholtz Zentrum Zellkulturtechniken erlernen zu können und die Gerätschaften zu nutzen, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Bärbl Amann danke ich besonders herzlich für das von ihr zur Verfügung gestellte Standardwerk „hab ich nicht, kann ich nicht, weiß ich nicht“, das sowohl Geschichten zur allgemeinen Aufheiterung und Grundregeln für das Arbeiten im Labor, als auch eine wertvolle Sammlung von Protokollen enthält. Besonders die Kapitel Immunhistochemie und Zellkultur haben mir sehr bei der Durchführung der Experimente geholfen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Hanna Zipplies für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen und die vielen Ratschläge und aufbauenden Worte, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Kollegen Frau Dr. Roxane Degroote, Herrn Dr. Florian Hofmaier und Frau Margarete Swadzba für die nette Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Sieglinde Hirmer, Konstantin Lutz und Carmen Ehrmann möchte ich mich für die freundliche Unterstützung im Labor bedanken.

Meinen Kollegen am Institut für Tierphysiologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Ein besonderes Dankeschön verdient Ramona Schmitt für die geduldige Beantwortung aller Fragen zur Zellkultur.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Annette Feuchtinger für die Hilfe bei der bildanalytischen Quantifizierung.

Bei Carolin Bobe bedanke ich mich für die Einführung in die Technik der Zellisolation und die Unterstützung bei allen im Helmholtz Zentrum durchgeführten Versuchen.

Bei der Familie Veit und den Mitarbeitern der Pferdemetzgerei Veit bedanke ich mich herzlich für die Überlassung der Pferdeaugen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Katharina Niedermeier für den entscheidenden Hinweis auf die Ausschreibung dieser Dissertation, die gemeinsame Bestreitung des Studiums und der Promotion und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Special thanks to Alexander Feenie for the great assistance with translation issues and for all our travels that were enjoyable distraction from everyday life of a PhD student.

Meiner lieben Familie danke ich ganz herzlich für die Unterstützung und den Rückhalt in jeder Lebenslage und für die Möglichkeit eines sorgenfreien Studiums und der anschließenden Promotion.