

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

Differentielle Proteomanalyse und Charakterisierung von
Oberflächenproteinen des retinalen Pigmentepithels
gesunder und an ERU erkrankter Pferde

von
Patrizia Barbara Uhl
aus
Aalen

München 2015

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

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer
Priv.-Doz. Dr. Johann Maierl
Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring
Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 18.Juli 2015

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	2
2.1 Equine rezidivierende Uveitis	2
2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild der ERU	2
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der ERU	3
2.1.3 Bedeutung der ERU	8
2.1.3.1 Die ERU unter Betrachtung veterinärmedizinischer Aspekte	8
2.1.3.2 Die ERU als wichtiges Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis	8
2.2 Das retinale Pigmentepithel	11
2.2.1 Aufbau und Funktionen des retinalen Pigmentepithels	12
2.2.1.1 Aufbau und Lage des retinalen Pigmentepithels	12
2.2.1.2 Funktionen des retinalen Pigmentepithels	13
2.2.2 Aufbau und Funktion der Blut-Retina-Schranke	20
2.2.3 Beteiligung der Blut-Retina-Schranke an der Pathogenese der Uveitis und weiterer Augenerkrankungen	20
2.3 Zelloberflächenproteine	25
2.4 Differentielle Proteomanalyse	27
3 PUBLIKATION I	30
4 PUBLIKATION II	44
5 DISKUSSION	60
6 ZUSAMMENFASSUNG	81
7 SUMMARY	83
8 LITERATURVERZEICHNIS	85
DANKSAGUNG	106

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μM	Mykromolar
μm	Mykrometer
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Å	Ångström
ACN	Acetonitril
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AMP	Adenosinmonophosphat
AQP	Aquaporin
ARPE-19	Humane retinale Pigmentepithel-Zelllinie
ARVO	<i>engl.</i> Association for Research in Vision and Ophthalmology
ATP	Adenosintriphosphat
BRS	Blut-Retina-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
BVMD	Best'sche vitelliforme Makuladystrophie
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>engl.</i> Cluster of differentiation
CCL	<i>engl.</i> Chemokine C-C motif ligand
cDNA	<i>engl.</i> Complementary deoxyribonucleic acid
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
cm	Zentimeter
CNG	<i>engl.</i> Cyclic nucleotide-gated ion channels; zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRALBP	<i>engl.</i> Cellular retinaldehyde-binding protein
CRBP	<i>engl.</i> Cellular retinol-binding protein
CTF	<i>engl.</i> Corrected total fluorescence
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHA	Docosahexaensäure
DIC	<i>engl.</i> Differential interference contrast
DIGE	Differenzielle Gelelektrophorese

DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco´s Modified Eagle Medium
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHV	Equines Herpesvirus
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
FA	<i>engl.</i> Formid acid
FCS	<i>engl.</i> Fetal calf serum
Fig.	<i>engl.</i> Figure
GABA	<i>engl.</i> Gamma-aminobutyric acid
GLUT	Glukosetransporter
GO	<i>engl.</i> Gene Ontology
h	Stunde(n)
H ⁺	Wasserstoff-Ionen
HAU	Humane autoimmune Uveitis
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HEK293	Menschliche embryonale Nierenzelllinie
HPLC	<i>engl.</i> High-performance liquid chromatography
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IRBP	<i>engl.</i> Interphotoreceptor retinoid-binding protein
ITRAQ	<i>engl.</i> Isobaric tags for relative and absolute quantitation
K ⁺	Kalium-Ionen
LC	<i>engl.</i> Liquid chromatography
LDL	<i>engl.</i> Low density lipoprotein
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LTQ	<i>engl.</i> Linear trap quadrupole
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MAC	Membranangriffskomplex
MALDI	<i>engl.</i> Matrix-assisted laser desorption/ionization; matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation
MCP	Monozytenchemotaktisches Protein
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>engl.</i> Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOWSE	<i>engl.</i> Molecular Weight Search
mRNA	<i>engl.</i> Messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Na ⁺	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
NaIO ₄	Natriumperiodat
NaOH	Natriumhydroxid
nl	Nanoliter
nmf193	<i>engl.</i> Neuroscience mutagenesis facility 193
Nr2e3	<i>engl.</i> Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3
p	Signifikanz
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>engl.</i> Pathogen-associated molecular patterns
PBS	<i>engl.</i> Phosphate buffered saline
PCR	<i>engl.</i> Polymerase chain reaction
PEDF	<i>engl.</i> Pigment epithelium-derived factor
PGE2	Prostaglandin E2
PNGase	Peptide-N-Glycosidase
POS	<i>engl.</i> Photoreceptor outer segments; äußere Segmente der Photorezeptoren
ppm	<i>engl.</i> Parts per million
PRPH2	Peripherin 2
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPE65	<i>engl.</i> Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SILAC	<i>engl.</i> Stable isotope labelling by amino acids in cell culture

Abkürzungsverzeichnis

siRNA	<i>engl.</i> Small interfering ribonucleic acid
SNARE	<i>engl.</i> Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TBS-T	<i>engl.</i> Tris buffered saline with Tween
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TOF	<i>engl.</i> Time-of-flight; Flugzeitmassenspektrometer
U	<i>engl.</i> Unit
VEGF	<i>engl.</i> Vascular endothelial growth factor
VMD2	<i>engl.</i> Vitelliform macular dystrophy-2
ZO	Zonula Occludens

1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine sehr häufige und schwere Augenerkrankung bei Pferden. Sie ist durch ein autoimmunes Geschehen und immer wiederkehrende Entzündungsschübe charakterisiert (Degroote et al. 2014). Sowohl in klinischen Aspekten, im Krankheitsverlauf wie auch in den stattfindenden immunpathologischen Vorgängen gibt es viele Gemeinsamkeiten zwischen der ERU und der humanen autoimmunen Uveitis (Deeg et al. 2007b, Degroote et al. 2013). Diese Übereinstimmungen und die Möglichkeit geeignete Proben von Pferden, die allen Umweltbedingungen ausgesetzt waren, in verschiedensten Stadien der Erkrankung zu bekommen, machen die ERU zu einem idealen und dem einzigen spontanen Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen (Degroote et al. 2013).

Das retinale Pigmentepithel (RPE) bildet die äußere Blut-Retina-Schranke und ist somit maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des Auges beteiligt (Szober et al. 2012). Durch die festen Zellverbindungen bildet das RPE zum einen eine stabile mechanische Barriere, zum anderen ist es befähigt mit Zellen und Mediatoren des Immunsystems zu interagieren (Juel et al. 2012, Park et al. 2014). Typische Merkmale der Uveitis sind der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke und der Übertritt von autoaggressiven T-Lymphozyten in das innere Auge mit anschließender Zerstörung retinaler Strukturen (Deeg et al. 2002b, Degroote et al. 2014). Mittels differentieller Proteomanalyse von gesunden und uveitischen Proben konnten bereits unterschiedlich exprimierte Proteine detektiert werden, die maßgeblich an der Pathogenese der ERU beteiligt sein könnten (Degroote et al. 2014, Hauck et al. 2010, Hauck et al. 2012, Zipplies et al. 2010a). Die sich am RPE abspielenden pathophysiologischen Mechanismen, welche für den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke verantwortlich sind, sind jedoch bislang noch weitestgehend unbekannt. Durch die ständige Interaktion und Kommunikation der RPE-Zellen mit ihrer Umgebung können gerade Änderungen des Expressionsmusters von Zelloberflächenproteinen Fehlfunktionen der physiologischen Prozesse hervorrufen. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, differentiell regulierte Zelloberflächenproteine zwischen RPE-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden zu detektieren, welche entscheidend an der Pathogenese der ERU beteiligt sein könnten.

2 LITERATUR

2.1 Equine rezidivierende Uveitis

2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild der ERU

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine schwere Augenerkrankung des Pferdes und stellt den häufigsten Grund für die Erblindung bei dieser Spezies dar (Degroote et al. 2014, Gilger et al. 2010). Charakteristisch für die ERU sind immer wiederkehrende progressive Phasen akuter Entzündung des inneren Auges und entzündungsfreie Intervalle, welche sich im Verlauf der Krankheit tendenziell verkürzen, wohingegen die Phasen akuter Entzündung entsprechend häufiger werden (Edelmann et al. 2014, Spiess 1997). Das klinische Bild eines akuten Entzündungsschubs ist sehr variabel. Abhängig davon, welche anatomischen Strukturen betroffen sind, reicht das Spektrum der Symptome von klinisch unauffällig bis hin zu starken Schmerzen mit hochgradiger Störung des Allgemeinbefindens (Spiess 1997). So ist eine Entzündung der Iris und des Ziliarkörpers (Iridozyklitis) meist sehr schmerzhaft und gekennzeichnet durch die charakteristische Abwehrtrias (Blepharospasmus, Lakrimation und Photophobie), des Weiteren können Miosis, Lidschwellung, gerötete Konjunktivalschleimhaut, Ansammlung eines entzündlichen Exsudates in der ventralen Hälfte der vorderen Augenkammer und Schwellung der Kornea auftreten (Rebhun 1979, Schwink 1992, Spiess 1997). Demgegenüber bleibt eine Entzündung der Choroidea mit Beteiligung der Retina (Chorioretinitis) oft unbemerkt, da es aufgrund fehlender sensibler Nervenfasern in der Choroidea zu keinen oder nur sehr milden Schmerzäußerungen kommt (Gilger and Michau 2004).

Letztendlich kommt es durch die immer wiederkehrenden Entzündungsschübe meist zu einer irreversiblen Zerstörung der inneren Augenstrukturen, wie z.B. vorderen und hinteren Synechien, Katarakten, peripapillären chorioretinitischen Narben und daraus resultierenden Netzhautablösungen (Gilger et al. 1999, Spiess 1997). Das Endstadium der Erkrankung geht daher meist mit der Erblindung des betroffenen Auges einher (Deeg et al. 2002a, Degroote et al. 2014, Schwink 1992).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der ERU

Während die Ursache der ERU bislang noch unbekannt ist, konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass es sich bei dem Pathomechanismus der rezidivierenden Erkrankung um ein immunmediertes Geschehen handelt (Deeg et al. 2002a, Deeg et al. 2006b, Degroote et al. 2014, Gilger 2010, Swadzba et al. 2012b). Erste Indizien für diese Vermutung ergaben sich aus dem wiederkehrenden Charakter der Erkrankung, der erfolgsversprechenden Therapie mit Kortikosteroiden und einem demgegenüber unzureichenden Therapieerfolg bei der Gabe von Antibiotika (Hines 1984, Rebhun 1979, Romeike et al. 1998, Spiess 1997). Gestützt wurde die Hypothese des immunmedierten Geschehens durch das Auffinden von T-Lymphozyten als vorherrschendem Zelltyp in Zellinfiltraten des Auges von an ERU erkrankten Pferden (Deeg et al. 2002a, Gilger et al. 1999, Kalsow and Dwyer 1998, Romeike et al. 1998). Im Rahmen dieser immunhistologischen Untersuchungen von Augen an ERU erkrankter Pferde konnten zudem Lymphfollikelaggregate vornehmlich im Stroma der Iris und der Choroidea detektiert werden (Deeg et al. 2002a, Romeike et al. 1998). Im Zentrum der Lymphfollikelaggregate wurden einige B-Lymphozyten gefunden, welche in der Peripherie von vielen T-Lymphozyten umgeben waren (Deeg et al. 2002a, Romeike et al. 1998). Die Charakterisierung der infiltrierenden T-Lymphozyten ergab, dass in Augen von an ERU erkrankten Pferden überwiegend T-Helferzellen (CD4⁺-T-Zellen) zu finden waren (Gilger et al. 1999). Des Weiteren wurde ein erhöhtes Interleukin-2- und Interferon gamma- und demgegenüber ein erniedrigtes Interleukin-4-Zytokinprofil in Iris und Ziliarkörper der uveitischen Augen festgestellt (Gilger et al. 1999).

T-Helferzellen (Th-Zellen) können sich nach Aktivierung durch bestimmte Transkriptionsfaktoren in verschiedene Effektorzellen differenzieren, bei Menschen und Mäusen unter anderem in die Th1-, Th2-, Th9-, Th17- und die regulatorischen T-Zellen (Cosmi et al. 2014, Okoye et al. 2014). Charakteristisch für die Th1-Zellen ist die Produktion von Interleukin-2 und Interferon gamma, welche vermehrt bei Autoimmunerkrankungen vorkommen, wie z.B. der Hashimoto-Thyreoiditis des Menschen (Phenekos et al. 2004). Wohingegen Th2-Zellen Interleukin-4 produzieren, das typischerweise vermehrt bei allergischen Reaktionen, wie Asthmaerkrankungen beim Menschen zu finden ist (Fajt and Wenzel 2014). Für die Th17-Zellantwort, die mit einer vermehrten Produktion von Interleukin-17 und Interleukin-23 einhergeht, konnte ebenso wie für die Th1-Zellantwort eine Beteiligung

an der Pathogenese von verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der Behçet-Krankheit nachgewiesen werden (Na et al. 2013). Durch die Detektion eines erhöhten Interleukin-2- und Interferon gamma-Zytokinprofils in Augen von an ERU erkrankten Pferden, konnte das immunmedierte Geschehen der ERU als eine zellvermittelte pro-inflammatorische Th1-Zellantwort charakterisiert werden (Gilger et al. 1999). Der von unserer Arbeitsgruppe erbrachte Nachweis einer erhöhten Expression von Interferon gamma in retinalen Müller-Gliazellen von an ERU erkrankten Pferden bestätigte ein Th1-mediertes Geschehen bei der ERU (Hauck et al. 2007). Immunhistologische Untersuchungen zur Immunantwort bei der ERU ergaben, dass es bei der ERU zusätzlich zur Th1-Zellantwort auch zu einer Th17-Zellantwort kommt, da die Zytokine Interleukin-6, Interleukin-17 und Interleukin-23 vermehrt in uveitischen equinen Augen nachgewiesen werden konnten, wohingegen diese Zytokine in gesunden equinen Augen weitestgehend abwesend waren (Regan et al. 2012). Auch bei Mäusen mit experimenteller autoimmuner Uveitis (EAU) konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Th1- als auch Th17-Zellen unabhängig voneinander eine wichtige Rolle bei der Immunantwort der Erkrankung spielen (Luger et al. 2008). Abhängig von der Art des EAU-Mausmodells wurde entweder eine vermehrte Th1- oder Th17-Zellantwort ausgebildet (Luger et al. 2008). So kam es bei Mäusen, die mit IRBP (Interphotoreceptor retinoid-binding protein) in komplettem Freund's Adjuvans immunisiert wurden, zu einer Th17-Effektorantwort, wodurch eine EAU trotz Abwesenheit von Interferon gamma ausgelöst werden konnte (Luger et al. 2008). Demgegenüber konnte in einem adoptiven Transfermodell eine EAU durch Th1-Effektorzellen unabhängig von Interleukin-17 induziert werden (Luger et al. 2008).

Ob es sich bei der ERU vermehrt um eine Th1- oder Th17-Zellantwort handelt oder ob beide gleichermaßen an der Pathogenese der ERU beteiligt sind, konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Dass jedoch eine T-Zell-medierte Erkrankung vorliegt, konnte – wie bereits oben erwähnt – durch das Auffinden von T-Lymphozyten als vorherrschendem Zelltyp in Zellinfiltraten von Augen an ERU erkrankter Pferde gezeigt werden (Deeg et al. 2002a, Gilger et al. 1999, Kalsow and Dwyer 1998, Romeike et al. 1998). Der Nachweis von autoreaktiven T-Zellen und IgG-Autoantikörpern im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden, welche spezifisch gegen die retinalen Antigene S-Antigen und IRBP gerichtet waren, lieferte weitere Erkenntnisse für die Pathogenese der ERU und ermöglichte die Hypothese,

dass es sich bei der ERU um eine Autoimmunerkrankung handeln könnte (Deeg et al. 2001). Ein weiteres Autoantigen, CRALBP (Cellular retinaldehyde-binding protein) konnte bei Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Serum-IgG ERU erkrankter Pferde auf retinalem Proteom erstmals identifiziert werden (Deeg et al. 2006b). Inwieweit die Immunreaktion gegen die detektierten Autoantigene pathogenetisch für die ERU relevant ist, wurde durch die experimentelle Induktion einer Immunantwort gegen diese Antigene bei augengesunden Pferden mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund getestet (Deeg et al. 2006b, Deeg et al. 2004, Deeg et al. 2002b).

Zunächst konnte gezeigt werden, dass durch die Auslösung einer Immunreaktion gegen IRBP eine Uveitis beim Pferd zu 100 % induzierbar war (Deeg et al. 2002b). Dieses Modell zeigte viele klinische sowie histologische Ähnlichkeiten zur spontan auftretenden ERU, wie z.B. die Bildung von lymphfollikelartigen Strukturen im inneren Auge und eine intraokuläre Infiltration von vornehmlich CD3⁺-Zellen. Des Weiteren zeichnete sich das Modell durch die induzierbaren Rezidive bei erneuten Injektionen von IRBP aus. So konnte ein geeignetes experimentell induzierbares Modell beim Pferd für die spontan auftretende Erkrankung präsentiert werden (Deeg et al. 2002b). Daraufhin wurde in einer weiteren Studie das uveitogene Potential von S-Antigen durch subkutane Injektion des Antigens in komplettem Freund's Adjuvans bei Pferden untersucht (Deeg et al. 2004). Dabei konnte nur bei einem von fünf Pferden eine Uveitis induziert werden, welche keinen rezidivierenden Charakter aufwies. Im Gegensatz zu IRBP zeigte S-Antigen also einen schwachen uveitogenen Charakter. Interessant war jedoch, dass bei allen fünf, gegen S-Antigen immunisierten Pferden eine Aktivierung von autoreaktiven T- und B-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen wurde, wobei die Infiltration in das innere Auge bei vier von fünf Pferden abgewehrt werden konnte (Deeg et al. 2004). Zuletzt konnte in einer weiteren Studie auch für CRALBP, einem erstmals identifizierten Autoantigen bei Uveitis, ein hohes uveitogenes Potential bei Pferden und auch bei Ratten nachgewiesen werden (Deeg et al. 2006b). Wie bei IRBP konnten durch wiederholte Injektionen von CRALBP ebenfalls Rezidive ausgelöst werden. Klinisch zeigten diese Pferde gelbliche Trübungen des Glaskörpers und Veränderungen am Augenhintergrund (Deeg et al. 2006b). Durch diese Induktionsversuche konnte die Hypothese der autoimmunmedierten Pathogenese der ERU bestätigt werden.

Eine weitere sehr wichtige Entdeckung, welche in den Experimenten zum uveitogenen Potential der Autoantigene IRBP und CRALBP bei der ERU gemacht werden konnte, war der Nachweis des Epitop Spreadings (Deeg et al. 2006b, Deeg et al. 2002b). Das Epitop Spreading beschreibt die Verschiebung der ursprünglich gegen ein Epitop eines Autoantigens gerichteten Autoreaktivität von T-Lymphozyten auf ein anderes Epitop des ursprünglichen oder anderer Autoantigene (Vanderlugt and Miller 1996). Es dient unter anderem als Erklärung für die immer wiederkehrenden Entzündungsschübe bei Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, Lupus erythematosus und Pemphigus foliaceus (Kurien et al. 2012, Li et al. 2003, D. Wang et al. 2014). Bei Pferden mit durch IRBP-induzierter Uveitis konnte eine initiale autoreaktive Reaktion der T-Lymphozyten gegen das IRBP-Peptid R14 und sieben Tage nach Beginn der Uveitis eine Reaktivität der T-Lymphozyten auf ein Peptid des S-Antigens gezeigt werden. Dieser Effekt wird als intermolekulares Spreading bezeichnet, da sich die Immunantwort auf ein anderes Autoantigen ausweitet (Deeg et al. 2002b). Auch intramolekulares Spreading, also eine Verschiebung der Immunantwort auf ein anderes Epitop desselben ursprünglichen Autoantigens, konnte bei den Pferden mit durch IRBP induzierter Uveitis gezeigt werden. So konnte kurz vor und während des ersten rezidiven Schubes eine Autoreaktivität von T-Lymphozyten gegen ein anderes Peptid von IRBP nachgewiesen werden (Deeg et al. 2002b). In einer Langzeitstudie zur Immunantwort von spontan an ERU erkrankten Pferden konnte sowohl inter- als auch intramolekulares Spreading nachgewiesen werden (Deeg et al. 2006a). Dabei konnte eine Verschiebung der Reaktivität von T-Zellen gegen S-Antigen auf IRBP oder umgekehrt detektiert werden, ebenso konnte eine Verschiebung der Immunantwort von T-Zellen auf ein anderes Epitop desselben ursprünglichen (S-Antigen oder IRBP) Autoantigens gezeigt werden (Deeg et al. 2006a). Dieser in mehreren Studien zur Pathogenese der ERU erbrachte Nachweis des Epitop Spreadings könnte wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen den charakteristisch rezidivierenden Verlauf der ERU erklären (Deeg et al. 2006a).

Ein weiteres Schlüsselereignis der ERU ist die Überwindung der Blut-Retina-Schranke (BRS) durch autoaggressive T-Lymphozyten mit anschließender Zerstörung des Zielorgans Retina (Deeg et al. 2002a, Deeg et al. 2004, Gilger et al. 1999). Ob es sich dabei primär um eine aktive Migration der autoaggressiven T-Lymphozyten über eine noch intakte BRS handelt oder initiale pathologische

Vorgänge zur funktionellen Störung der BRS führen, welche einen passiven Übertritt der autoaggressiven T-Lymphozyten zulassen, konnte bisher nicht geklärt werden. Ein Zusammenbruch der BRS bei der ERU konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden und stellt ein typisches Merkmal der ERU dar (Deeg et al. 2007a, Deeg et al. 2002a, Deeg et al. 2001).

Das Auffinden von Tetanustoxoid-Antikörpern in Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden gab erste Hinweise auf einen Zusammenbruch der BRS im Verlauf der ERU (Deeg et al. 2001). Des Weiteren konnten klassische Plasmaproteine wie Albumin und eine erhöhte Gesamtproteinkonzentration in uveitischen Glaskörpern im Vergleich zu gesunden Glaskörpern detektiert werden, was deutlich für eine nicht mehr intakte BRS sprach (Deeg et al. 2007a). Auch histologisch konnte der Zusammenbruch der BRS eindeutig nachgewiesen werden (Deeg et al. 2002a). Aufgrund der weitestgehend avaskulären Retina beim Pferd, ist bei dieser Spezies vor allem die äußere BRS bedeutend, die durch das retinale Pigmentepithel (RPE) gebildet wird (Szober et al. 2012). Interessanterweise konnte beim Vergleich des Glaskörper-Proteinexpressionsmusters von gesunden und erkrankten Pferdeaugen eine erniedrigte Konzentration von PEDF (Pigment epithelium-derived factor) im uveitischen Glaskörper detektiert werden (Deeg et al. 2007a, Hauck et al. 2012). PEDF wird von RPE-Zellen gebildet und ist an der Aufrechterhaltung der BRS beteiligt, indem PEDF eine antagonistische Wirkung zu VEGF (Vascular endothelial growth factor) aufweist, welches eine vermehrte Durchlässigkeit der BRS hervorrufen kann (Ablonczy et al. 2009). Dies konnte in einem RPE-Barriere-Modell mit PEDF oder VEGF behandelten ARPE-19 Zellen, einer humanen RPE-Zelllinie, demonstriert werden (Ablonczy et al. 2009). Bei der ERU konnte gezeigt werden, dass die erniedrigte Expression von PEDF in uveitischer Retina in Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von VEGF einhergeht, was darauf schließen ließ, dass die beiden von RPE-Zellen exprimierten Proteine entscheidend am Zusammenbruch der BRS beteiligt sein könnten (Deeg et al. 2007a).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Pathogenese der ERU um ein autoimmunmediertes Geschehen handelt, bei dem es zur Überwindung der BRS durch autoreaktive T-Zellen kommt, die mit einer Zerstörung von retinalen Strukturen einhergeht. Welche genauen Mechanismen sich dabei abspielen und wie es zur Überwindung der BRS kommt, konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden.

2.1.3 Bedeutung der ERU

2.1.3.1 Die ERU unter Betrachtung veterinärmedizinischer Aspekte

Schon im römischen Reich war die ERU unter dem Namen Oculus Lunaticus bekannt, da sie auf den periodischen Einfluss des Mondes zurückgeführt wurde (Braun 1995). Wegen unzureichenden Wissens wurde die ERU bis ins 18. Jahrhundert meist mit Aderlass therapiert (Braun 1995). Zwar gab es im Laufe der Zeit einen erheblichen Wissenszuwachs über die am häufigsten vorkommende Augenerkrankung der Pferde, jedoch konnten die Ätiologie und die Pathogenese der ERU bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Vor allem aus tierschutzrelevanten Gründen kommt der ERU eine große Bedeutung zu. Die Gattung der Pferde gehört zu den Fluchttieren (Blanke et al. 2014). So lebt ein an ERU erkranktes Pferd mit eingeschränktem oder vollständigem Verlust des Sehvermögens, abgesehen von verminderter Lebensqualität und auftretenden Schmerzen, häufig mit Stress und Angst, was zu einem gestörten Verhalten mit unkontrollierten Bewegungen des Pferdes führen kann. Sowohl für das Pferd selbst als auch für die im Umgang mit dem Pferd stehenden Personen können diese Verhaltensmuster eine ernste Gefahr darstellen. Aus Sicherheits- und Tierschutzgründen ist deshalb häufig eine Euthanasie der betroffenen Pferde notwendig (Gilger et al. 1999), was zu erheblichen ideellen und wirtschaftlichen Verlusten führt. Daher ist es von großer Bedeutung, weitere Fortschritte in der Erforschung der ERU zu erzielen, um baldmöglichst die Ätiologie und die Pathogenese der Erkrankung vollständig aufklären und somit eine zielgerichtete Therapie für die betroffenen Pferde entwickeln zu können.

2.1.3.2 Die ERU als wichtiges Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis

Die humane autoimmune Uveitis (HAU) stellt in den westlichen Ländern die am weitesten verbreitete Art der Uveitiden dar und ist einer der häufigsten Gründe für den Verlust des Sehvermögens beim Menschen (Barry et al. 2014, Horai et al. 2013). Sie kann idiopathisch auftreten oder als okuläre Manifestation systemischer autoimmuner Erkrankungen wie Spondylarthritiden, Morbus Behçet, Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom oder Multipler Sklerose (Barisani-Asenbauer et al. 2012). Charakteristisch für die autoimmune Uveitis sind die Überwindung der BRS durch autoreaktive T-Zellen mit anschließender Zerstörung retinaler Strukturen und die immer wiederkehrenden Entzündungsschübe (Degroote et al. 2013). Bei vielen

humanen Uveitis-Patienten richten sich autoreaktive T-Zellen gegen die retinalen Autoantigene S-Antigen und IRBP, was z.B. mittels Proliferationsassays von peripheren Blutlymphozyten gezeigt werden konnte (Takeuchi et al. 2010). Auch Immunreaktionen gegen CRALBP konnten sowohl bei der ERU wie auch bei der HAU nachgewiesen werden (Deeg et al. 2006b, Deeg et al. 2007b). Ein autoimmunmediertes Geschehen steht außer Frage, jedoch konnten die genauen pathophysiologischen Vorgänge bei der HAU wie auch bei der ERU, trotz bedeutender Fortschritte bei der Erforschung der HAU in den letzten Jahren, noch nicht vollständig geklärt werden. Um eine zielgerichtete Therapie für diese Erkrankungen entwickeln zu können, ist es von großer Bedeutung die für die Erkrankung verantwortlichen pathophysiologischen Vorgänge genau zu verstehen. Geeignetes Probenmaterial von HAU Patienten für Untersuchungen zur Pathogenese der HAU ist meist nur sehr schwer und auch nur im Endstadium der Erkrankung zu erhalten (Caspi 2014). Daher muss bei der Erforschung von den bei der rezidivierenden Uveitis stattfindenden pathophysiologischen Mechanismen auf geeignete Tiermodelle zurückgegriffen werden.

Die experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) ist eine beim Tier meist durch retinale Autoantigene wie S-Antigen und IRBP induzierte Uveitis (Agarwal et al. 2012, Gasparin et al. 2012). Am häufigsten werden für dieses Tiermodell bestimmte Mäusestämme, wie z.B. B10.RIII-Mäuse, oder Lewis-Ratten verwendet (Agarwal et al. 2012). Unter anderem konnte eine Uveitis aber auch bei Meerschweinchen, Kaninchen und Primaten experimentell induziert werden (Eisenfeld et al. 1987, Nussenblatt et al. 1981, Wacker and Lipton 1965). Die erfolgreiche Induktion einer EAU bei Ratten durch den adoptiven Transfer von CD4⁺-T-Lymphozyten erbrachte wegweisende Erkenntnisse für die immunpathologischen Vorgänge bei der EAU (Mochizuki et al. 1985). Dabei wurden die CD4⁺-T-Lymphozyten vorab *in vivo* in einem Donortier mit S-Antigen sensibilisiert und nach der Entnahme aus dem Donortier *in vitro* mit S-Antigen aktiviert, um dann ins Empfängertier transferiert zu werden (Mochizuki et al. 1985). So konnte gezeigt werden, dass es sich bei der EAU um eine CD4⁺-T-Zell-medierte Erkrankung handelt, dies stellte auch eine für die Erforschung der HAU wichtige Erkenntnis dar (Mochizuki et al. 1985). Dennoch kann keines der verschiedenen EAU-Tiermodelle die spontane autoimmune Uveitis des Menschen vollständig repräsentieren (Caspi 2010). Die Defizite der EAU-Modelle liegen vor allem in der Homogenität der Inzucht-Stämme und den selten auslösbaren

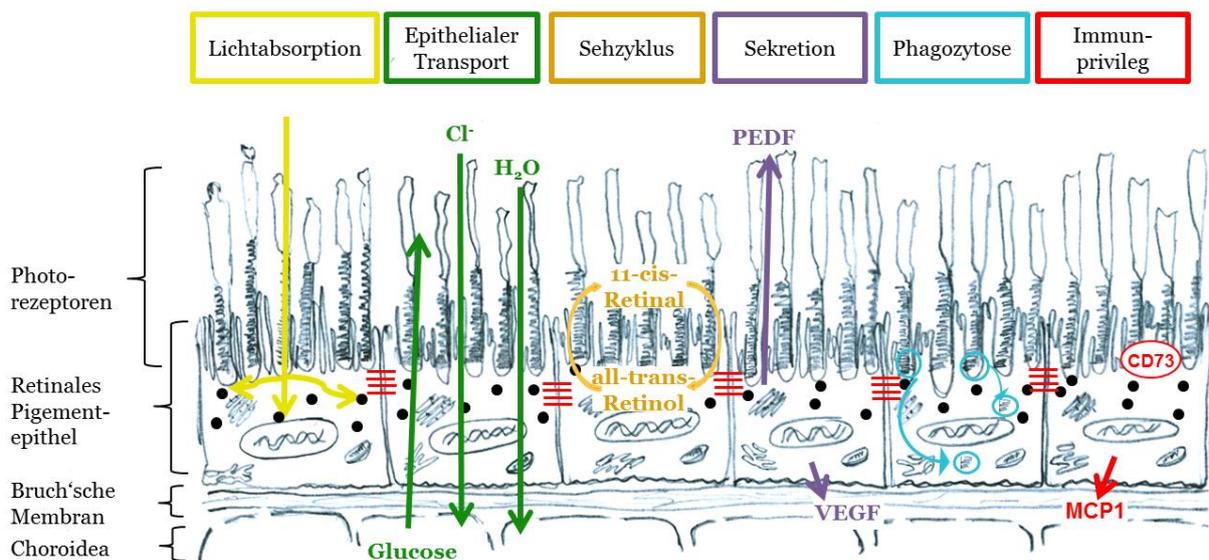
Rezidiven bei Ratten oder nur unvorhersehbar spontan auftretenden Rezidiven im Mausmodell (Agarwal et al. 2012, Caspi 2003). Zudem ist das auslösende Agens bei der EAU bereits bekannt, was die Erforschung der initiierenden Faktoren der HAU unmöglich macht. Da wesentliche Merkmale der HAU aber das spontane Auftreten, ein heterogener genetischer Hintergrund und die rezidivierenden Entzündungsschübe sind, ist hierfür das Tiermodell der EAU nur eingeschränkt verwendbar.

Durch die Gemeinsamkeiten in Klinik, Verlauf und Pathogenese zwischen der ERU und der HAU nimmt die ERU einen besonderen Stellenwert als Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen ein (Deeg et al. 2008, Deeg et al. 2006b, Degroote et al. 2014). Sie ist derzeit das einzige spontane Tiermodell für die HAU und zeigt vor allem durch ihren chronisch-rezidivierenden Charakter große Ähnlichkeiten zum Krankheitsbild der autoimmunen Uveitis beim Menschen (Degroote et al. 2014). Geeignete Proben von an ERU erkrankten Pferden sind in allen Stadien der Erkrankung und mit nur sehr kurzen *post mortem* Zeiten zu erhalten. Dies erlaubt es Proteine der an der Pathogenese der ERU beteiligten Strukturen, wie z.B. der Retina und dem RPE, so nah wie möglich in ihrem *in vivo* Vorkommen zu untersuchen und mit gesunden Kontrollen zu vergleichen. Ein weiterer Vorteil der spontanen Uveitis beim Pferd als Modell für die HAU ist, dass die Pferde, gleich den humanen Patienten, jeglichen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren und durch einen breitgefächerten genetischen Hintergrund eine hohe Heterogenität aufweisen. Auch experimentell lässt sich beim Pferd durch die Immunisierung mit IRBP eine Uveitis induzieren, welche sowohl klinisch als auch histologisch der spontanen Erkrankung sehr ähnelt (Deeg et al. 2002b). Die Besonderheit dabei ist, dass die Entzündungsschübe vorhersehbar in bestimmten Zeitabständen re-induzierbar sind, was sie deutlich von den anderen Tiermodellen abhebt (Deeg et al. 2002b). Dies ermöglicht die gezielte Erforschung von pathophysiologischen Vorgängen, die sich im Verlauf der entzündungsfreien Intervalle und während der charakteristischen rezidivierenden-progressiven Entzündungsschübe abspielen. Zudem erlauben die induzierbaren Rezidive beim Pferd die Bewertung möglicher langfristiger Therapieansätze für die HAU. Das Pferd stellt somit ein sehr geeignetes Modell für die autoimmune Uveitis beim Menschen dar, da sowohl die experimentell induzierte wie auch die spontane Erkrankung große Vorteile mit sich bringen und beide in derselben Spezies untersucht werden können. Dass die ERU sowie die experimentell induzierte Uveitis beim Pferd von höchstem Stellenwert für die

Erforschung der autoimmunen Uveitis des Menschen ist, zeigte auch die Detektion von CRALBP als Autoantigen bei der ERU, mit welchem bei gesunden Pferden zu 100 % eine experimentell induzierte Uveitis auslösbar war (Deeg et al. 2006b) und welches anschließend als retinales Autoantigen für die HAU bestätigt werden konnte (Deeg et al. 2007b).

2.2 Das retinale Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) liegt als einschichtiges kubisches Epithel zwischen der äußeren Schicht der Photorezeptoren und der Bruch'schen Membran mit anschließender Choroidea und bildet dort die äußere Schicht der Blut-Retina-Schranke (BRS) (Willermain et al. 2014). So stellt das RPE eine funktionelle und mechanische Immunbarriere dar, die den Immunstatus des Auges als immunprivilegiertes Organ aufrechterhält (Gregerson et al. 2007). Weitere bedeutende Funktionen sind Lichtabsorption, Schutz der Retina vor oxidativem Stress, epithelialer Transport, Re-Isomerisierung von all-trans-Retinol zu 11-cis-Retinal im Sehzyklus sowie Sekretion und Phagozytose (Simo et al. 2010).



Modifiziert nach : Strauss, O. (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3), pp. 845-81.

Abbildung 1: Überblick über den Aufbau und die Funktionen des retinalen Pigmentepithels (RPE) am Beispiel der Maus. Das RPE steht apikal über seine Mikrovilli mit den Photorezeptoren und basal mit der Bruch'schen Membran und den daran angrenzenden fenestrierten Gefäßen der Choroidea in Kontakt. Zu den wichtigsten Funktionen des RPEs gehören Lichtabsorption, epithelialer Transport, Beteiligung am Sehzyklus, Sekretion, Phagozytose und Aufrechterhaltung des Immunprivilegs des Auges. PEDF (Pigment epithelium-derived growth factor); VEGF (Vascular endothelial growth factor); MCP1 (Monozytenchemotaktisches Protein 1).

2.2.1 Aufbau und Funktionen des retinalen Pigmentepithels

2.2.1.1 Aufbau und Lage des retinalen Pigmentepithels

Das RPE ist ein im Auge an die neuronale Retina angrenzendes, in hexagonaler Form angeordnetes, einschichtiges pigmentiertes Epithel (Amirpour et al. 2014). Topographisch sind die RPE-Zellen in der Fovea am dichtesten angeordnet, in der Peripherie wird die Dichte demgegenüber zunehmend geringer, dies konnte an humanen Augen gezeigt werden (Ach et al. 2014). Dabei weisen die RPE-Zellen in der Fovea die größte Höhe auf und besitzen zudem einen geringeren Durchmesser als die RPE-Zellen in der Peripherie (Ach et al. 2014, Sparrow et al. 2010). Apikal steht das RPE mit seinen dort angeordneten Mikrovilli in engem Kontakt mit den äußeren Segmenten der Photorezeptoren (POS) (siehe Abbildung 1) (Gu et al. 2012). Die Mikrovilli vergrößern die Oberfläche der RPE-Zellen um das 30-fache, was die wichtige Interaktion von Photorezeptor- und RPE-Zellen bedeutend erleichtert (Miller and Steinberg 1977). Auch über den subretinalen Raum, welcher mit einer extrazellulären Matrix gefüllt ist, findet eine Interaktion des RPEs mit den Photorezeptoren statt (Kelley et al. 2014). Die basale Membran der RPE-Zellen steht mit der Bruch'schen Membran und den darunterliegenden fenestrierten Endothelzellen der Choroidea in Verbindung. Die Bruch'sche Membran stellt hierbei die Matrix dar, über welche die Kommunikation zwischen RPE und Choroidea stattfinden kann (Guymer et al. 1999). Lateral sind die RPE-Zellen über Tight-Junctions verbunden (siehe Abbildung 1) (Simo et al. 2010). Diese durch das RPE mit seinen Tight-Junctions gebildete feste mechanische und physikalische Barriere stellt die äußere BRS dar (Park et al. 2014). Die physikalische Barriere gewährleistet die Aufrechterhaltung der für Epithelzellen typischen Eigenschaft der Zellpolarität (Burke 2008). Die Polarität der RPE-Zelle bewirkt, dass Proteine, Organellen und Funktionalitäten oft asymmetrisch in der Zelle verteilt sind. So sind z.B. der Zellkern, die Mitochondrien und der Golgi-Apparat vorrangig basal zu finden, während die Melanosomen vermehrt apikal anzutreffen sind (Sparrow et al. 2010).

Als einschichtiges Epithel mag das RPE eher unscheinbar wirken, jedoch steht dieser simple Aufbau in großem Kontrast zu seinen vielseitigen Funktionen und seiner Wichtigkeit für das Immunprivileg des Auges. Dies soll in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

2.2.1.2 Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Lichtabsorption und Schutz der Retina vor oxidativem Stress

Das RPE kleidet den hinteren Teil des inneren Auges aus und ist durch die Einlagerung von Melanosomen stark pigmentiert (El-Beltagy 2014). Somit stellt die Lichtabsorption die offensichtlichste und lange Zeit auch einzig geglaubte Funktion des Epithels dar (Strauss 2005). Eintreffendes Licht durchläuft die Photorezeptorschicht und wird anschließend von den Melanosomen in den RPE-Zellen absorbiert (siehe Abbildung 1) (Sparrow et al. 2010). Dies verhindert Streustrahlung und somit auch eine wiederholte Reizung der Photorezeptorzellen (Strauss 2005). Der sehr häufige und durch die Linse stark konzentrierte Lichteinfall im Auge führt einerseits zu hohen Temperaturen in den lichtabsorbierenden Melanosomen und andererseits zur Bildung von freien Radikalen und oxidativem Stress der Retina (Juel et al. 2013). Da die Choroidea eine sehr hohe Durchblutungsrate besitzt, die sogar höher als die der Niere ist, besteht die Hypothese, dass die in den Melanosomen abgefangene Hitze von dem in der Choroidea zirkulierenden Blut abtransportiert werden kann (Parver 1991). Zur effektiven Abwehr von oxidativem Stress dient in erster Linie die Absorption des Lichts durch pigmentierte Granula im RPE (Kaczara et al. 2012). Melanin hat nicht nur eine absorbierende Wirkung, sondern fungiert zusätzlich als Radikalfänger (Zareba et al. 2006). Des Weiteren besitzen die RPE-Zellen eine Vielzahl an nicht-enzymatischen (Karotinoide, Ascorbinsäure) oder enzymatischen (Superoxiddismutase, Katalase) Antioxidantien (Miceli et al. 1994, Simo et al. 2010). Diese Eigenschaften befähigt das RPE im physiologischen Zustand, die Retina effektiv vor oxidativer Schädigung zu schützen (Strauss 2005).

Epithelialer Transport

Das RPE bildet mit seinen lateral liegenden festen Tight-Junctions ein dichtes Epithel zwischen neuronaler Retina und Choroidea (Park et al. 2014). Die Zulieferung von Nährstoffen, der Abtransport von metabolischen Endprodukten sowie die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts im subretinalen Raum müssen somit über transepithelialen Transport durch das RPE sichergestellt werden (siehe Abbildung 1) (Miura et al. 2010, Sparrow et al. 2010).

Betrachtet man die Transportvorgänge von basal nach apikal, so sind die Hauptmetaboliten, die von der Choroidea durch das RPE zu den Photorezeptoren

transportiert werden, Glukose für den Energiestoffwechsel, Retinal für den Sehzyklus und Fettsäuren als essentielle Phospholipidmembran-Bestandteile der Photorezeptoren (Simo et al. 2010). Der Glukosetransport wird über die Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 gewährleistet, welche sowohl basal (hin zur Choroidea) als auch apikal (hin zu den Photorezeptoren) exprimiert werden (Ban and Rizzolo 2000). Über GLUT-3 wird der Grundbedarf an Glukose gedeckt, wohingegen GLUT-1 spezialisierter ist und ein Glukosetransport über diesen Kanal nur bei erhöhtem Bedarf induziert wird (Ban and Rizzolo 2000). Der Transport von Retinol oder seinem Isomer Retinal ist von großer Bedeutung für den Sehzyklus. Vorrangig wird das von den Photorezeptoren kommende all-trans-Retinol, welches mithilfe von IRBP rezeptorvermittelt ins RPE aufgenommen wird, dort zu 11-cis-Retinal umgewandelt und wieder an die Photorezeptoren zurücktransportiert (Muniz et al. 2014). Ein kleiner Teil des Retinols wird zudem von den RPE-Zellen rezeptorvermittelt aus der Choroidea aufgenommen, in Retinal isomerisiert und an die Photorezeptoren weitertransportiert, von wo es dann in den Sehzyklus eintritt (Vogel et al. 2002). Ein wichtiger Bestandteil der Photorezeptormembran, welcher z.B. Photorezeptoren von Mäusen zusammen mit Neuroprotectin D1 vor Stress-induzierter Apoptose schützt, ist die mehrfach ungesättigte Fettsäure Docosahexaensäure (DHA) (Kanan et al. 2014). Diese kann nicht von den Photorezeptoren selbst synthetisiert werden und muss deshalb über das RPE von der Choroidea aufgenommen werden (Uauy et al. 2001). Die DHA wird beispielsweise bei Mäusen im Blut zusammen mit einem Lipoprotein transportiert und vom RPE konzentrationsabhängig über Fettsäurerezeptoren aufgenommen (Bazan et al. 1993, Scott and Bazan 1989).

Bei den Transportvorgängen von apikal nach basal, also aus dem subretinalen Spalt hin zur Choroidea, werden vor allem Wasser, Ionen und metabolische Endprodukte vom RPE transportiert (Hamann et al. 2000, Maminishkis et al. 2002). Der Abtransport des im subretinalen Raum anfallenden Wassers durch das RPE hin zur Choroidea wird hauptsächlich durch den aktiven Transport von Cl^- und einem Wasserstoff-Laktat-Ko-Transporter angetrieben, dies konnte z.B. an kultivierten RPE-Zellen von Schweinen nachgewiesen werden (Hamann et al. 2003, Hu et al. 1996). Die Energie für diesen transepithelialen Transport wird von der apikal liegenden Na^+/K^+ -ATPase geliefert (Marmorstein 2001, Ostwald and Steinberg 1980). Zudem wird der Wassertransport im physiologischen Zustand des RPEs durch vorhandene

Aquaporin-Kanäle, wie z.B. Aquaporin 1 in humanen RPE-Zellen und Aquaporin 5, 9, 11 und 12 in RPE-Zellen von Ratten erleichtert (Hollborn et al. 2011, Stamer et al. 2003). Um den Säure-Basen-Haushalt in der Retina aufrecht zu erhalten, besitzt das RPE apikal einen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ und basolateral einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher, mithilfe derer je nach pH-Wert H^+ oder HCO_3^- aufgenommen oder abgegeben werden können (Lin and Miller 1991, Lin and Miller 1994). Die zahlreichen metabolischen Vorgänge in den Photorezeptoren führen zu einer hohen Laktatproduktion (Gallagher-Colombo et al. 2010). Anfallendes Laktat kann über den sich apikal befindenden Monocarboxylat-Transporter (MCT) 1 aufgenommen und über den basal liegenden MCT3 an die Blutbahn abgegeben werden (Gallagher-Colombo et al. 2010). Somit ist das RPE im physiologischen Zustand in der Lage, die Retina vor Übersäuerung zu schützen.

Re-Isomerisierung von all-trans- zu 11-cis-Retinal im Sehzyklus

Der in den Photorezeptoren und im RPE stattfindende Sehzyklus wird als klassischer Sehzyklus angesehen (Parker and Crouch 2010). Des Weiteren gibt es auch einen alternativen Zyklus, bei dem die Umwandlung des all-trans-Retinols in das 11-cis-Retinal in den Müller-Gliazellen der Retina und nicht wie beim klassischen Sehzyklus im RPE stattfindet (Takahashi et al. 2011). Dieser alternative Zyklus wird auch zapfenspezifischer Weg genannt, da das hier umzuwandelnde all-trans-Retinol ausschließlich von den Zapfen an die Müller-Gliazellen abgegeben wird (Takahashi et al. 2011). Wie bereits erwähnt, ist das RPE entscheidend in den klassischen Sehzyklus involviert (siehe Abbildung 1). Der klassische Sehzyklus beginnt mit der Absorption eines Photons durch das Chromophor 11-cis-Retinal in der Membran der äußeren Photorezeptoren, welches sich dann in seiner Konformation ändert und zu all-trans-Retinal wird (Schafer and Farrens 2014). All-trans-Retinal wird durch eine membrangebundene Retinol-Dehydrogenase zu all-trans-Retinol reduziert und in den subretinalen Raum abgegeben (Liu et al. 2015). Dort wird all-trans-Retinol an IRBP gebunden zum RPE transportiert, wo es dann mittels CRBP (Cellular retinol-binding protein) zu einem Enzymkomplex weitertransportiert wird (Betts-Obregon et al. 2014, Nossoni et al. 2014). Hier wird all-trans-Retinol zuerst durch die Lecithin-Retinol-Transferase verestert (Muniz et al. 2014), anschließend katalysiert ein weiteres Enzym, RPE65, die Hydrolyse dieses Esters und nutzt die Energie zur Isomerisierung des all-trans-Retinols in 11-cis-Retinal (Muniz et al. 2014). Die 11-cis-

Retinol-Dehydrogenase oxidiert dann wiederum 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal (Muniz et al. 2014). Gebunden an CRALBP wird 11-cis-Retinal wieder an die apikale Membran des RPEs transportiert, dort von IRBP aufgenommen und zurück zu den Photorezeptoren befördert, wo es erneut in den Sehzyklus eintreten kann (Betts-Obregon et al. 2014, Muniz et al. 2014).

Sekretion

Für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der Funktionen des RPEs und der Photorezeptoren ist eine ausgedehnte Interaktion zwischen den beiden Komponenten unabdingbar (Strauss 2005). Hierfür dient die Kommunikation über Oberflächenproteine, zudem ist das RPE in der Lage, die Interaktion durch Sekretion von Wachstumsfaktoren auch über weite Distanzen zu steuern (Dithmer et al. 2014, McKay et al. 1997). Sekretiert werden z.B. der Basic fibroblast growth factor, Transforming growth factor beta, Insulin-like growth factor 1, Ciliary neurotrophic factor, Platelet-derived growth factor, Pigmented epithelium-derived growth factor (PEDF) und der Vascular endothelial growth factor (VEGF) (Li et al. 2011, Liegl et al. 2014, Simo et al. 2006). Hierbei spielen vor allem PEDF und VEGF auch in Zusammenhang mit verschiedenen Augenerkrankungen, wie der altersabhängigen Makuladegeneration des Menschen, eine bedeutende Rolle (Farnoodian et al. 2015). PEDF wird im physiologischen Zustand apikal am RPE sekretiert, was z.B. an fetalen humanen RPE-Zellen, nativen RPE-Zellen von Affen und humanen ARPE-19 gezeigt werden konnte (Ablonczy et al. 2011, Becerra et al. 2004). Durch seine neuroprotektive und antiangiogenetische Wirkung ist PEDF entscheidend an der Aufrechterhaltung von retinalen und auch choriokapillären Strukturen beteiligt (Strauss 2005). Eine neuroprotektive Wirkung konnte bei einem durch Sauerstoff induzierten Retinopathie-Mausmodell gezeigt werden, bei dem PEDF durch die supprimierende Wirkung auf Interleukin-1-beta eine Reduktion neurotoxischer Glutamatkonzentrationen bewirkte (Y. Wang et al. 2014). Als antiangiogenetischer Faktor wirkt PEDF über die Inhibition endothelialer Zellproliferation und Stabilisierung des choriokapillären Endothels (Haurigot et al. 2012, Ogata et al. 2002). Im physiologischen Zustand des RPEs wird VEGF basal und in geringeren Mengen als PEDF vom RPE sekretiert, was an humanen kultivierten RPE-Zellen gezeigt werden konnte (Sonoda et al. 2010). In einer Studie zur Funktion von VEGF im RPE von Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass VEGF wichtig für die Aufrechterhaltung

der Fenestrierung des choriokapillären Endothels und für die Verbindung des RPEs mit den äußeren Photorezeptorsegmenten ist (Ford et al. 2011). Kommt es zur Verletzung der retinalen Strukturen, wird das RPE stimuliert und es werden weitere neuroprotektive Wachstumsfaktoren wie der Basic fibroblast growth factor sekretiert, was bei Mäusen mit mechanisch durchgeführter Verletzung der Retina gezeigt wurde (Wen et al. 1995). So ist das RPE mit der Aufrechterhaltung der retinalen und choriokapillären Struktur in der Lage, sowohl die Sehkraft, als auch die Nährstoffversorgung des Auges zu sichern (Strauss 2005).

Phagozytose

Die hohe ins Auge eintreffende Lichtenergie führt zu einer konstanten photo-oxidativen Zerstörung der lichtsensiblen äußeren Segmente der Photorezeptoren (POS) (Juel et al. 2013). Um die Funktion der POS, die mit der Aufrechterhaltung der Sehkraft verbunden ist, dennoch weiter gewährleisten zu können, müssen diese ständig erneuert werden (Mazzoni et al. 2014). Die Umsatzrate eines kompletten POS beträgt in etwa zehn Tage (Wavre-Shapton et al. 2014). Die RPE-Zellen sind in der Lage, die dabei abgeworfenen Fragmente der POS zu phagozytieren, zu verdauen oder essentielle Substanzen wie das Retinal zu recyceln und den POS wieder zur Verfügung zu stellen (siehe Abbildung 1) (Wavre-Shapton et al. 2014). Die tägliche Aufnahme einer Vielzahl an Photorezeptorfragmenten macht die RPE-Zellen zu den aktivsten phagozytierenden Zellen des Körpers (Wavre-Shapton et al. 2014). Die Phagozytoseaktivität ist dabei abhängig vom Hell-Dunkel-Rhythmus und der stattfindenden Interaktion zwischen RPE und Photorezeptoren (LaVail 1976, Young 1977). Wie am Beispiel des Goldfisches gezeigt werden konnte, werden die abgeworfenen Fragmente der Stäbchen vermehrt in den Morgenstunden und die der Zapfen vermehrt nach Eintreten der Dunkelheit phagozytiert (O'Day and Young 1978). Durch Integrine, wie das $\alpha\beta 5$ -Integrin der Maus, werden die Fragmente der Photorezeptoren an die apikale Membran der RPE-Zellen gebunden (Nandrot et al. 2012). Der Tyrosinkinase c-mer Rezeptor aktiviert nach der spezifischen Bindung der POS durch die Integrine an die apikalen Membran der RPE-Zellen eine Second-Messenger Kaskade, welche die Internalisierung der POS initiiert (Nandrot et al. 2012, Tang et al. 2015). Über die weitere Entwicklung der dann gebildeten Phagosomen ist bisher wenig bekannt. Man weiß jedoch, dass sie zur Reifung von

apikal nach basal wandern, dort mit Lysosomen fusionieren und anschließend abgebaut werden (Wavre-Shapton et al. 2014).

Immunprivileg des Auges

Der heutige Begriff „Immunprivileg des Auges“ wurde 1948 von Peter Medawar geprägt. Ausschlaggebend hierfür war seine Entdeckung, dass es bei der Transplantation von Hautstücken in die vordere Augenkammer von Kaninchen erst sehr viel später zu einer Abstoßungsreaktion kam als bei anderen Körperteilen (Medawar 1948). Lange Zeit wurde die Hypothese vertreten, dass es sich bei immunprivilegierten Organen, wie z.B. dem Gehirn und dem Auge, um eine immunologische Ignoranz der Organe gegenüber dem Immunsystem handle. Heute jedoch weiß man, dass es sich vielmehr um einen dynamischen Prozess handelt, bei dem die Organe aktiv mit dem Immunsystem in Kontakt treten und so durch physiologische, mechanische und immunologische Eigenschaften vor immunmedierten Entzündungsvorgängen geschützt sind (Nieder Korn 2012, Nieder Korn and Stein-Streilein 2010). Das RPE verfügt über zwei Möglichkeiten dieses Privileg aufrecht zu erhalten. Zum einen stellt das RPE im physiologischen Zustand durch seine festen Zellverbindungen eine für Bestandteile des Immunsystems nahezu unüberwindbare mechanische Barriere zum inneren Auge dar (Park et al. 2014). Zum anderen ist das RPE in der Lage mit dem Immunsystem über die Produktion von immunstimulierenden oder immunsuppressiven Faktoren zu kommunizieren. So konnte die Produktion von verschiedenen Chemokinen durch ARPE-19 Zellen nach Stimulation mit aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden (Juel et al. 2012). Außerdem zeigte sich eine immunstimulierende Wirkung von RPE-Zellen durch die Sekretion von Interleukin-8 nach Stimulation von ARPE-19 Zellen mit pro-inflammatorischen Faktoren wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Sphingosine 1-Phosphat (Qiao et al. 2012). Auch eine erhöhte Expression des monozytenchemotaktischen Proteins 1 (MCP1), welches die Anlockung von Makrophagen bewirkt, war in RPE-Zellen von Mäusen, welche einer verstärkten Lichteinwirkung ausgesetzt waren, nachweisbar (Narimatsu et al. 2013). An kultivierten humanen RPE-Zellen konnte beobachtet werden, dass RPE-Zellen nach Stimulation mit Interferon gamma die sogenannten MHC II (Major histocompatibility complex) Moleküle zur Antigenpräsentation exprimieren, wodurch wiederum T-Zellen stimuliert werden (Osusky et al. 1997). Des Weiteren ist das RPE in der Lage Toll-

like Rezeptoren (z.B. TLR3, 4 und 9) zu exprimieren, welche nach der Bindung von sogenannten PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) das Immunsystem aktivieren, was an ARPE-19 Zellen, welche mit Herpes Simplex Virus beimpft wurden, gezeigt werden konnte (Moses et al. 2014).

Eine immunsuppressive Wirkung von RPE-Zellen konnte an frisch isolierten RPE-Zellen von Mäusen untersucht und nachgewiesen werden (Chen et al. 2014). Bei diesen RPE-Zellen stellte man in Zellkulturversuchen fest, dass sie durch die Expression von CD73, welches das pro-inflammatorisch wirkende Adenosintriphosphat (ATP) in das immunsuppressive Adenosin umwandelt, die Proliferation von CD4⁺-Zellen supprimieren (Chen et al. 2014). Bei Untersuchungen mit Ratten-RPE wurde beobachtet, dass das RPE eine durch Antigene, Mitogene und Interleukin-2 verursachte Lymphozytenproliferation durch Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) und Stickstoffoxide unterbinden kann (Liversidge et al. 1994, Liversidge et al. 1993). Dieser vom RPE ausgehende, hemmende Effekt auf die Lymphozytenproliferation konnte durch den Vergleich zweier Lymphozytenproliferationsassays einmal mit und einmal ohne RPE Ko-Kultivierung gezeigt werden (Liversidge et al. 1994, Liversidge et al. 1993). Des Weiteren konnte in einer immortalisierten murinen RPE-Zelllinie die Expression von MHC II Molekülen festgestellt werden, welche Peptidbruchstücke präsentierten, die statt stimulierend aktivitätssenkend auf T-Lymphozyten wirkten (Gregerson et al. 2007). Untersuchungen an humanen nativen RPE-Zellen, welche entweder direkt oder durch ein Transwell getrennt mit aktivierten T-Lymphozyten für 24 Stunden ko-kultiviert wurden, ergaben, dass RPE-Zellen zusätzlich in der Lage sind durch Sekretion der löslichen Faktoren CD54 und PGE2, immunsuppressiv auf die durch T-Lymphozyten bedingte Ausschüttung der Chemokine CCL3 und CCL4 zu wirken (Wallace et al. 2013).

Wie wichtig die Funktion des RPEs zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs ist, verdeutlichen die vielen Augenerkrankungen, die mit einer Störung seitens der Blut-Retina-Schranke in Zusammenhang gebracht werden (Degroote et al. 2014, Lee et al. 2014, Loukovaara et al. 2014, Park et al. 2014, Wang et al. 2011). Auf die Funktion der Blut-Retina-Schranke und deren Bedeutung in verschiedenen Augenerkrankungen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

2.2.2 Aufbau und Funktion der Blut-Retina-Schranke

Die Blut-Retina-Schranke (BRS) stellt eine sehr wichtige anatomische Struktur dar, welche entscheidend für die Erhaltung des immunprivilegierten Status des Auges ist (Szober et al. 2012). Sie wird von zwei Komponenten gebildet, der inneren und der äußeren BRS (Arredondo Zamarripa et al. 2014). Die innere BRS besteht aus über Tight-Junctions dicht verknüpften Endothelzellen der retinalen Blutgefäße, welche zusätzlich von Perizyten, Astrozyten und Müller-Gliazellen umhüllt und abgedichtet werden (Yao et al. 2014). Die äußere BRS wird von ebenfalls über durch Tight-Junctions dicht verknüpften RPE-Zellen gebildet (Park et al. 2014). Das Pferd stellt hier eine Besonderheit dar, da es aufgrund einer weitestgehend avaskulären Retina nur eine äußere BRS besitzt (Szober et al. 2012). Das RPE ist ein einschichtiges kubisches Epithel, welches apikal mit den Photorezeptoren und basal mit der Bruch'schen Membran und der Choroidea in Verbindung steht (Willermain et al. 2014). So stellt es zum einen eine feste mechanische, zum anderen aber auch eine durch Produktion oder Sekretion verschiedenster Immunmodulatoren mit dem Immunsystem interagierende Barriere zwischen dem inneren Auge und den Blutgefäßen der Choroidea dar (s. Kap. 2.2.1) (Juel et al. 2013, Park et al. 2014). Die BRS ist maßgeblich daran beteiligt, das Immunprivileg des Auges aufrecht zu erhalten und somit den Erhalt des Visus zu gewährleisten (Szober et al. 2012). Zudem ist sie auch für die strukturelle und physiologische Integrität der Retina von großer Bedeutung (Kim et al. 2009). Dies wird durch zahlreiche Augenerkrankungen verdeutlicht, die im Zusammenhang mit einer nicht mehr intakten BRS stehen. Beispiele hierfür sind die equine rezidivierende Uveitis, die humane autoimmune Uveitis, die altersbedingte Makuladegeneration und die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (Daudin et al. 2011, Degroote et al. 2014, Lee et al. 2014, Wang et al. 2011). Diese werden im Folgenden näher erläutert.

2.2.3 Beteiligung der Blut-Retina-Schranke an der Pathogenese der Uveitis und weiterer Augenerkrankungen

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine häufig auftretende schwere Augenerkrankung bei Pferden (Gilger et al. 2010). Durch das Auffinden autoreaktiver T-Zellen gegen retinale Autoantigene konnte ein autoimmunmediertes Geschehen der ERU nachgewiesen werden (Degroote et al. 2014). Ein wichtiges Schlüsselereignis der ERU ist der Zusammenbruch der BRS (Szober et al. 2012). In

den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden konnten aus dem Blut stammende Tetanustoxoid-Antikörper detektiert werden, dies erbrachte den ersten Hinweis für eine nicht mehr intakte BRS (Deeg et al. 2001). Ein zusätzlicher Hinweis für das Zusammenbrechen der BRS ergab sich aus der Detektion einer erhöhten Konzentrationen von klassischen Serumproteinen wie Albumin und einer erhöhten Gesamteiproteinkonzentration in Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden (Deeg et al. 2007a, Hauck et al. 2007). In Gewebeschnitten von an ERU erkrankten Pferden konnte der Zusammenbruch der BRS eindeutig nachgewiesen werden (Deeg et al. 2002a). Ebenso wurde in histologischen Schnitten von Pferdeaugen mit durch CRALBP experimentell induzierter Uveitis ein totaler Verlust des RPEs und somit eine vollkommene Zerstörung der BRS vorgefunden (Deeg et al. 2006b). Welche pathophysiologische Vorgänge sich an der BRS in Zusammenhang mit der ERU abspielen, ist nicht geklärt. Ob es sich dabei um ein primäres funktionelles Geschehen an der BRS handelt, welches den autoreaktiven T-Zellen erlaubt die Schranke zu überqueren, oder ob der Zusammenbruch der BRS sekundär durch die von den T-Zellen verursachte Zerstörung der retinalen Strukturen bedingt ist, ist derzeit noch fraglich. Jedoch gibt es mehrere Hinweise darauf, dass am RPE stattfindende pathologische Vorgänge zu einer funktionellen Störung der BRS führen. So konnten z.B. auch von RPE-Zellen exprimierte Proteine wie das Apolipoprotein A1 und PEDF differentiell abundant in den Glaskörpern von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden, was vielmehr als Zeichen einer funktionellen Störung des RPEs angesehen wurde, anstatt alleinig einen Zusammenbruch der BRS widerzuspiegeln (Deeg et al. 2007a). In uveitischen Glaskörpern war Apolipoprotein A1 dabei höher abundant (Deeg et al. 2007a). Die genaue Funktion von Apolipoprotein A1 in RPE-Zellen ist bislang nicht bekannt, allerdings konnte es auch als hochreguliert im Glaskörper und in RPE-Zellen von Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie detektiert werden (Simo et al. 2008). Die Konzentration von PEDF war in uveitischen Glaskörpern geringer im Vergleich zu Kontrollen (Deeg et al. 2007a). PEDF ist ein wichtiges, vom RPE apikal sekretiertes Protein, welches eine neuroprotektive Wirkung auf Photorezeptoren hat und die endotheliale Zellproliferation verhindert, was im Mausmodell gezeigt werden konnte (Haurigot et al. 2012, Y. Wang et al. 2014). Ein weiterer Hinweis darauf, dass autoreaktive T-Zellen die BRS erst nach vorangegangener funktioneller Störungen der BRS überqueren können, konnte in einer von unserer Arbeitsgruppe

durchgeführten Studie zum uveitogenen Potential von S-Antigen gefunden werden (Deeg et al. 2004). Dabei konnte bei nur einem von fünf Pferden eine Uveitis mit in das Augenninnere infiltrierenden autoaggressiven T-Zellen ausgelöst werden (Deeg et al. 2004). Interessanterweise wurden aber bei allen Pferden autoreaktive T-Zellen gegen S-Antigen im Blut nachgewiesen, von denen es einige bis in die Choroidea geschafft hatten, es jedoch zu keiner Migration durch die BRS kam (Deeg et al. 2004). Zu Klärung der pathophysiologischen Vorgänge an der BRS, die den Übertritt von autoreaktiven T-Zellen ermöglichen, sind weitere Studien erforderlich.

Auch im Hinblick darauf, dass die ERU das einzige spontane Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis (HAU) darstellt (s. Kap. 2.1.3.2), ist die Erforschung von pathophysiologischen Vorgängen an der BRS bei der ERU von großer Bedeutung (Szober et al. 2012). Denn wie bei der ERU spielt die Beteiligung von RPE-Zellen an der Pathogenese der HAU eine entscheidende Rolle, was z.B. in einem Modell mit ARPE-19 Zellen gezeigt wurde (Chen et al. 2011). Dabei konnte durch Inkubation eines ARPE-19 Monolayers mit für die HAU charakteristischen Zytokinen aufgrund einer Zerstörung der Tight-Junctions eine vermehrte Durchlässigkeit des Monolayers hervorgerufen werden (Chen et al. 2011). Da jedoch geeignetes Probenmaterial bei der HAU nur sehr schwer und meist auch nur im Endstadium der Erkrankung zu erhalten ist, wird neben der ERU auf weitere etablierte Tiermodelle wie das der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) zurückgegriffen, um die pathophysiologischen Vorgänge der Uveitis zu erforschen (Caspi 2010). Die EAU eignet sich durch die von den standardisierten Grundvoraussetzungen erreichte hohe interne Validität insbesondere für Untersuchungen, bei denen die Auswirkungen durch einen bestimmten veränderten Faktor analysiert werden sollen. Bei der EAU konnte ein Zusammenbruch der BRS bei Mäusen nach Immunisierung mit IRBP und bei Ratten nach Immunisierung mit S-Antigen durch vermehrte Extravasation von Albumin detektiert werden (Luna et al. 1997, Xu et al. 2003). Die genauen Pathomechanismen, die zum Zusammenbruch der BRS bei der EAU führen, sind, wie auch bei der ERU, bislang nicht vollständig geklärt. Viele immunstimulierende Moleküle, wie Interleukin-6, Interleukin-17, Interferon gamma, TNF α , Toll-like Rezeptoren, MHC Antigene und VEGF, die z.B. von Mäuse- oder Ratten-RPE sekretiert werden, konnten in Zusammenhang mit dem Zusammenbruch der BRS und damit in Zusammenhang mit der Pathogenese der EAU gebracht werden (Bamforth et al. 1996, Caspi 2010, Chen et al. 2013, Luna et al. 1997). Erst kürzlich

konnte bei Mäusen mit IRBP-induzierter EAU eine niedrigere Expression von CD73, einem Enzym, welches das pro-inflammatorische ATP zu dem immunsuppressiven Adenosin konvertiert, in RPE-Zellen im Vergleich zu nicht uveitischen Mäusen nachgewiesen werden (Chen et al. 2014). Des Weiteren konnte in einem Proliferationsassay, bei dem RPE-Zellen und T-Zellen ko-kultiviert wurden, gezeigt werden, dass CD73 positive RPE-Zellen in Beteiligung von Adenosinmonophosphat (AMP) eine T-Zell-Proliferation hemmen (Chen et al. 2014). Demgegenüber hatten CD73 negative RPE-Zellen keinen Einfluss auf die T-Zell Proliferation und somit wurde die sonst von gesundem RPE ausgehende immunsuppressive Wirkung im Falle der EAU gemindert (Chen et al. 2014). Zusammenfassend konnte bislang in vielen Studien eine entscheidende Beteiligung des RPEs als Teil der BRS an den bei der Uveitis stattfindenden Pathomechanismen nachgewiesen werden. Jedoch sind die genauen Mechanismen wie es zum Funktionsverlust der BRS und dem Eintreten von autoaggressiven T-Zellen in das innere Auge kommt noch nicht vollständig geklärt.

Die Beteiligung der BRS an vielen weiteren Augenerkrankungen verdeutlicht die Wichtigkeit der weiteren Erforschung von an der BRS beteiligten Strukturen. Das RPE nimmt hierbei einen besonderen Stellenwert ein. Durch die Interaktion mit dem Immunsystem und seinen benachbarten Strukturen sowie die Vielzahl seiner aufrechterhaltenden Funktionen steht das RPE im Zentrum der bei der Uveitis und anderen Augenerkrankungen stattfindenden pathophysiologischen Vorgänge. Da solche Interaktionen meist über Oberflächenproteine ablaufen, ist das Verständnis der dort stattfindenden Veränderungen besonders wichtig. Erkenntnisse die durch die Untersuchungen von am RPE ablaufenden Mechanismen bei den verschiedenen Augenerkrankungen gewonnen werden, könnten möglicherweise zum Teil auch auf die autoimmune Uveitis und umgekehrt die bei der Uveitis gewonnenen Erkenntnisse auf die anderen Augenerkrankungen übertragbar sein. Dies würde zu einem effektiveren und schnelleren Voranschreiten bei der Aufklärung der sich am RPE abspielenden Pathomechanismen beitragen.

Eine sehr bedeutende Augenerkrankung, die sich zu solch vergleichenden Analysen aufgrund der Beteiligung des RPEs an ihrer Pathogenese gut eignet, ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Sie stellt die häufigste Ursache für die Erblindung älterer Menschen dar (Smailhodzic et al. 2014). Definiert wird sie als chronisch-progressive Erkrankung, welche mit degenerativen Veränderungen der

Makula und des retinalen Pigmentepithels und der Bildung von Drusen einhergeht (Ferris et al. 2013). Mit der Pathogenese der AMD werden vor allem Mechanismen in Verbindung gebracht, die die physiologischen Funktionen des RPEs (siehe Kap. 2.2.1.2) beeinträchtigen (Qin and Rodrigues 2008). Dazu gehören unter anderem oxidativer Stress, die daraus resultierende Akkumulation von Lipofuscin, die Bildung von Drusen und eine gestörte choriokapilläre und retinale Angiogenese (Farnoodian et al. 2015, Steinberg et al. 2014, Tan et al. 2015, Zhao et al. 2014). Drusen sind abgegrenzte, Protein- oder Lipid-gefüllte Einlagerungen zwischen der Bruch'schen Membran und dem RPE, die schon aufgrund ihrer Lokalisation die Funktionen des RPEs beeinträchtigen. Zudem können sie pro-inflammatorische Mediatoren wie z.B. Amyloid-beta enthalten, welche das RPE zur Sekretion von Interleukin-6, TNF- α , Interleukin-1 β und Interleukin-18 stimulieren (Liu et al. 2013). Dies konnte nach intravitrealer Injektion von Amyloid-beta 1-40 an Ratten-RPE gezeigt werden (Liu et al. 2013). Dass die veränderte Expression von Oberflächenproteinen des RPEs an der Pathogenese der AMD entscheidend beteiligt sein könnte, zeigt die Bedeutung von CD36 in RPE-Zellen (Picard et al. 2010). CD36 wird von RPE-Zellen basolateral exprimiert und ist dort in der Lage schädigende Lipoproteine (oxidiertes LDL) aufzunehmen (Picard et al. 2010). Bei CD36-defizienten Mäusen konnten typische Anzeichen einer AMD festgestellt werden (Houssier et al. 2008). Das Fehlen der CD36-Expression führt zur Ansammlung dieser toxischen Lipoproteine und zur Verdickung der Bruch'schen Membran, einem typischen Merkmal der AMD (Picard et al. 2010).

Auch Genmutationen können zur Veränderung von Proteinexpressionen führen, welche dann mit einer Funktionsstörung des RPEs einhergehen (Johnson et al. 2013). Bei der Uveitis ist hierzu bislang nichts bekannt, jedoch führt eine Mutation des vitelliformen Makuladystrophie Typ 2-Gens (VMD2-Gen), welches das RPE-spezifische Protein Bestrophin kodiert, zu einer weiteren Form der Makuladegeneration, der autosomal-dominant vererbten Best'schen vitelliformen Makuladystrophie (BVMD) (Johnson et al. 2013). Typische Anzeichen der BVMD sind Akkumulation von Lipofuszin in den RPE-Zellen, Netzhautabhebungen und ein mit Flüssigkeit und Debris gefüllter subretinaler Raum (Zhang et al. 2010). Es besteht derzeit die Hypothese, dass Mutationen dieses VMD2-Gens zu Änderungen der Proteinexpression von Bestrophin führen (Zhang et al. 2010). Da Bestrophin in der basolateralen Membran des RPEs lokalisiert ist und dort als Ca²⁺ aktivierter Cl⁻

Kanal fungiert, könnten Änderungen im Expressionsmuster von Bestrophin Funktionsstörungen des RPEs, wie z.B. Störungen im Flüssigkeitstransport, hervorrufen (Zhang et al. 2010). Weitere Untersuchungen zu den sich am RPE abspielenden pathophysiologischen Mechanismen bei den oben genannten Augenerkrankungen und bei der Uveitis selbst werden tiefere Einblicke in die bislang noch weitestgehend ungeklärten Pathomechanismen an der äußeren BRS ermöglichen.

2.3 Zelloberflächenproteine

Die molekulare Zusammensetzung der Zelloberfläche und deren dynamische Veränderungen liefern wichtige Erkenntnisse über die Interaktion einer Zelle mit ihrer Umgebung (Wollscheid et al. 2009). So ist die Erforschung des Zelloberflächenproteoms von großer Bedeutung, um sowohl das physiologische als auch pathologische Kommunikationsverhalten von Zellen mit ihrer Umgebung besser verstehen zu können (Elschenbroich et al. 2010). Die Oberflächenproteine können nach Almen et al. in vier Gruppen eingeteilt werden: Rezeptoren, Enzyme, Proteine mit Transportfunktion und Sonstige (Almen et al. 2009). Zu den Rezeptoren gehören G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen, Antigenrezeptoren und Pattern-Recognition Rezeptoren (Almen et al. 2009). Zu den Enzymen zählen Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen (Almen et al. 2009). In der Gruppe der Proteine mit Transportfunktion finden sich Kanäle, Solute Carriers und aktive Transporter (Almen et al. 2009). Unter Sonstige fallen Adhäsionsmoleküle, Liganden und Proteine mit unbekannter Funktion (Almen et al. 2009). Veränderungen, die sich sowohl an der extra- als auch an der intrazellulären Seite der Plasmamembran abspielen, werden von den Zelloberflächenproteinen durch ihre dynamische Expression, Lokalisation, Strukturveränderung und Interaktion mit anderen Molekülen wiedergespiegelt (Sun 2014). So kann sich die Zusammensetzung des Oberflächenproteoms je nach physiologischen und pathologischen Bedingungen stark verändern. Um diese dynamischen Prozesse erfassen zu können, ist es daher von hoher Relevanz, sich nicht mit den Oberflächenproteinen auf Genomebene zu beschäftigen, sondern das Zelloberflächenproteom selbst zu analysieren (Apweiler et al. 2009). Die Heterogenität, der amphiphile Charakter der Membranproteine und ihre relativ niedrige Abundanz stellen eine Schwierigkeit für die Probenverarbeitung und

Anreicherung der Membranproteine dar (Tan et al. 2008, Zheng and Foster 2009). Die heutzutage entwickelten Methoden zur Verarbeitung und Anreicherung von Membranproteinen und die Weiterentwicklung von nicht-Gel-basierten Systemen in der Massenspektrometrie erleichtern inzwischen die Untersuchungen der Zelloberflächenproteome enorm (Holley et al. 2015). Gängige Methoden zur Anreicherung von Zelloberflächenproteinen sind z.B. das Koppeln an kationische kolloidale Siliciumoxid-Beads, die Anreicherung von Glykoproteinen durch Lektine und die Oberflächenbiotinylierung (Elschenbroich et al. 2010).

Bei der Anreicherung durch kationische kolloidale Siliciumoxid-Beads lagern sich die kationischen Silicium Mikrobeads an die negativ geladene Zelloberfläche an (Kim et al. 2011). Die kationischen Beads werden anschließend mit einem anionischen Polymer vernetzt (Kim et al. 2011). Durch mehrere Zentrifugationsschritte werden die Membranproteine von den Beads und Debris getrennt (Kim et al. 2011). Die schnelle Beschichtung mit anschließender Vernetzung erhält die native Struktur und Lokalisation der Proteine innerhalb der Lipiddoppelschicht und schützt vor chemischer und enzymatischer Manipulation (Kim et al. 2011). Diese Methode ermöglicht die Unterscheidung zwischen verschiedenen Proteinlokalisationen, wie z.B. basal oder apikal, indem auf einem Monolayer aus Epithel- oder Endothelzellen *in vitro* zuerst die apikale Seite mit den Beads beschichtet wird, welche dann zusammen mit der Zytoplasma- und der Nukleusfraktion mittels eines Lysepuffers bis hin zur Basalmembran abgelöst wird. Die apikalen Membranproteine werden anschließend durch mehrere Zentrifugationsschritte erst von der Zytoplasma- und Nukleusfraktion und dann von den Beads getrennt (Stolz and Jacobson 1992).

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen (Apweiler et al. 1999). Daher stellt die Anreicherung von Glykoproteinen eine hochselektive Methode dar, um die meisten Oberflächenproteine anzureichern (Sparbier et al. 2005). Hierbei werden die glykosylierten Oberflächenproteine mit Hilfe von über Säulen immobilisierten Lektinen, wie z.B. Concanavalin A, eingefangen (Kaji et al. 2006).

Bei der Oberflächenbiotinylierung werden die Membranproteine kovalent an Biotin, z.B. Aminoxybiotin, gebunden und anschließend über einen Avidin/Streptavidin beschichteten Träger (z.B. Harze, Beads oder Mikrotiterplatten) adsorbiert (Elschenbroich et al. 2010). In einem nächsten Schritt werden ungebundene Proteine ausgewaschen und die spezifisch gebundenen Proteine anschließend mit Trypsin

verdaut (Szober et al. 2012). Die im Überstand enthaltene tryptischen Proteinfraction wird durch Zentrifugieren gewonnen (Szober et al. 2012). Werden die noch übriggebliebenen Beads mit einer glycerolfreien Peptid-N-Glykosidase (PNGase) F versetzt, kann zusätzlich die glykopeptidische Fraktion gewonnen werden (Szober et al. 2012).

Die durch diese Verfahren angereicherten Oberflächenproteine können dann z.B. massenspektrometrisch identifiziert und anschließend einer genauen Analyse unterzogen werden.

2.4 Differentielle Proteomanalyse

Die Proteomik umfasst die Untersuchungen des Proteoms. Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller vorliegenden Proteine in einer Zelle oder eines Gewebes unter bestimmten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt (Wilkins et al. 1996a, Wilkins et al. 1996b). Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom sehr dynamisch, durch veränderte Bedingungen kann es sich in seiner qualitativen sowie quantitativen Zusammensetzung ständig ändern (Apweiler et al. 2009). Die differentielle Proteomik ermöglicht die Untersuchung dieser Änderungen unter bestimmten Bedingungen, wodurch ein unvoreingenommener Vergleich zwischen z.B. gesundem und erkranktem Gewebe möglich ist und somit neue Erkenntnisse über pathophysiologische Vorgänge gewonnen werden können (Deeg et al. 2007a, Hauck et al. 2010, Hauck et al. 2012, Hauck et al. 2007, Zipplies et al. 2010a). Eine geeignete Methode, um differentiell exprimierte Proteine zu identifizieren, ist die Massenspektrometrie (Paul et al. 2013).

Wie der Name schon andeutet, wird bei der Massenspektrometrie die molekulare Masse von geladenen Partikeln durch Messung ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) bestimmt (Paul et al. 2013). Das Massenspektrum stellt dabei eine Auftragung der Ionenhäufigkeit gegen m/z dar (Paul et al. 2013). Ein Massenspektrometer besteht aus drei grundlegenden Komponenten: der Ionenquelle (z.B. Elektrospray Ionisation), dem Analysator (z.B. eine Ionenfalle, in der die Ionen durch magnetische und elektrische Felder nach ihrem m/z aufgetrennt werden können) und dem Detektor (erfasst die Anzahl der Ionen eines bestimmten m/z Verhältnisses) (Paul et al. 2013, Tatituri et al. 2015). Die Selektivität dieser Methode kann entscheidend erhöht werden, indem man mehrere Analysatoren hintereinander schaltet, dies wird als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet (MS/MS) (Dongre et al. 1997). Durch

eine vorangeschaltete Flüssigkeitschromatographie (LC) vor das Tandem-Massenspektrometer, LC-MS/MS genannt, kann die Identifikation der Proteine zusätzlich verbessert werden (Beck et al. 2011). Die Proteine werden hierbei zuerst enzymatisch verdaut und anschließend in einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) aufgetrennt (Chen and Pramanik 2008). Die dabei entstehenden Fraktionen werden massenspektrometrisch analysiert (Chen and Pramanik 2008). Die anschließende Identifikation der Proteine erfolgt über den Vergleich der detektierten Massenspektren der Peptide mit Proteinsequenzdatenbanken (Degroote et al. 2014). Hierfür können Programme wie MASCOT verwendet werden (Degroote et al. 2014). Die Quantifizierung der Proteine kann auf der Markierung der Peptide mit einem Label oder auf Label-freien Methoden basieren (Butler et al. 2010, Hauck et al. 2012).

Die von Ross et al. eingeführte quantitative Methode ITRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) stellt ein Beispiel für eine Labeling-Methode dar (Ross et al. 2004). Die ITRAQ-Label bestehen aus einer Reportergruppe, einer Balancegruppe und einer aminoreaktiven Gruppe (Chen et al. 2010). Nach Trypsin-Verdau werden die Proben mit den ITRAQ-Reagenzien, die unterschiedliche Molmassen aufweisen, markiert, anschließend vereinigt, chromatographisch fraktioniert und schließlich massenspektrometrisch untersucht (Chen et al. 2010). Eine weitere Labeling-Methode ist SILAC (Stable isotope labelling by amino acids in cell culture) (Mann 2006). Hierbei werden in der Zellkultur *in vivo* isotopenmarkierte Aminosäuren metabolisch in die Zelle eingebaut (Mann 2006). Vorteile der SILAC-Methode sind eine hohe Nachweisempfindlichkeit und die Möglichkeit, mehr als zwei Zustände miteinander vergleichen zu können (Lange et al. 2010).

Nachteile der Label-Methoden sind aufwändige Probenvorbereitungen, hohe Probenkonzentrationen und teilweise unvollständiges Labeling, daher werden in der Proteomforschung immer häufiger Label-freie Methoden genutzt (Patel et al. 2009). Diese stellen eine sehr effiziente und mit sehr guten Ergebnissen einhergehende Methode zur Identifizierung von Peptiden und darauffolgender Erschließung eines globalen Proteinprofils einer Probe dar (Bantscheff et al. 2007). Label-freie Techniken sind schnell, einfach durchzuführen, günstig und zudem kann nahezu jedes lösliche biologische Material untersucht werden (Aoshima et al. 2014).

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, können durch Analyse des Oberflächenproteoms einer Zelle wichtige Informationen über die Kommunikation der Zellen untereinander

und mit deren Umgebung sowie über zahlreiche pathogenetische Vorgänge gewonnen werden (Elschenbroich et al. 2010). Um so nah wie möglich die *in vivo* stattfindenden Prozesse analysieren zu können ist es erforderlich, natives oder *ex vivo* Probenmaterial zu untersuchen, was durch die mittels differentieller Proteomanalyse nachgewiesenen grundlegenden Änderungen des Proteomprofils nativer und kultivierter Zellen verdeutlicht wurde (Szober et al. 2012). Deshalb war der Ausgangspunkt dieser Arbeit Oberflächenproteine von gesunden und uveitischen equinen RPE-Zellen *in situ* durch eine neuartige Biotinylierungsmethode anzureichern, mittels LC-MS/MS zu identifizieren und anschließend ihre differentielle Regulation zwischen gesund und krank zu analysieren, um differentiell regulierte Proteine der ERU so nah wie möglich an ihrem physiologischen und pathologischen Auftreten *in vivo* zu identifizieren.

3 PUBLIKATION I

Titel

“*In situ* cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis”

Autoren

Patrizia B. Uhl, Christoph M. Szober, Barbara Amann, Claudia Alge-Priglinger, Marius Ueffing, Stefanie M. Hauck und Cornelia A. Deeg

Journal

Journal of Proteomics

Status

Publiziert.

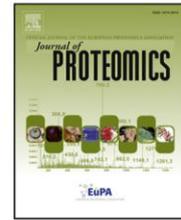
J Proteomics. 2014 Sep 23; 109:50-62.

doi: 10.1016/j.jprot.2014.06.020. Epub 2014 Jul 2.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.020>

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis[☆]



P.B. Uhl^a, C.M. Szober^a, B. Amann^a, C. Alge-Priglinger^b, M. Ueffing^{c,d},
S.M. Hauck^c, C.A. Deeg^{a,*}

^aInstitute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

^bDepartment of Ophthalmology, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

^cResearch Unit for Protein Science, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health GmbH, Neuherberg, Germany

^dCentre of Ophthalmology, University Medical Centre, Eberhard-Karls-University Tuebingen, Tuebingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2014

Accepted 20 June 2014

Available online 2 July 2014

Keywords:

Retinal pigment epithelium

Proteomics

In situ biotinylation

Synaptotagmin 1

Basigin

Collectrin

ABSTRACT

Retinal pigment epithelium (RPE) builds the outer blood–retinal barrier of the eye and plays an important role in pathogenesis of the sight threatening disease equine recurrent uveitis (ERU). ERU is a spontaneous autoimmune mediated inflammatory disease characterised by the breakdown of the outer blood–retinal barrier and an influx of autoaggressive T-cells into the inner eye. Therefore, identification of molecular mechanisms contributing to changed function of blood–retinal barrier in ERU is important for the understanding of pathophysiology. Cell surface proteins of RPE collected from healthy horses and horses with ERU were captured by in situ biotinylation and analysed with high resolution mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC–MS/MS) to identify differentially expressed proteins. With label free differential proteomics, a total of 27 differently expressed cell surface proteins in diseased RPE could be detected. Significant down-regulation of three very interesting proteins, synaptotagmin 1, basigin and collectrin was verified and further characterised.

Biological significance

We applied an innovative and successful method to detect changes in the plasma cell surface proteome of RPE cells in a spontaneous inflammatory eye disease, serving as a valuable model for human autoimmune uveitis. We were able to identify 27 differentially expressed plasma cell membrane proteins, including synaptotagmin 1, basigin and collectrin, which play important roles in cell adhesion, transport and cell communication.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

[☆] This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), DE 719/4-1 to C.D., PR 1248/2-2 to C.A.-P. and HA 6014/2-2 to S.H.

* Corresponding author at: Institute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians University, Veterinärstr. 13, 80539 München, Germany. Tel.: +49 89 2180 1630; fax: +49 89 2180 2554.

E-mail address: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de (C.A. Deeg).

1. Introduction

Mass spectrometry has become an essential method to investigate quantitative and qualitative changes of the proteome in different biological states [1]. The different types of mass spectrometric analysis are developing rapidly. For example, label-free, non-gel-based tandem mass spectrometry with preceding liquid chromatography (LC-MS/MS) is a highly precise and sensitive high-throughput technique, which enables analysis of complex and widely dynamic protein concentrations [2]. Furthermore, it is a more convenient and efficient method to investigate insoluble proteins such as cell surface proteins in comparison to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) [1].

Cell surface proteins, making up 30% of the whole proteome, represent a very important group of proteins [3]. They are, among others, involved in communication and interaction of cells, demarcation of compartments and the transport of ions and dissolved substances [4]. Due to their location on the cell surface, changes in their expression cause dysfunctions of cell interaction and communication. Thereby it happens that immune cells recognize cell surface proteins as foreign substances, which can lead to autoimmune diseases [5].

A very important sight threatening disease of horses is equine recurrent uveitis (ERU). ERU is a spontaneous, organ-specific autoimmune disease characterised by recurrent inflammation of the inner eye [6]. Many matches in clinical as well as immunopathological aspects make ERU the only spontaneous animal model for human autoimmune uveitis [7].

There are two types of blood–retinal barriers in the eye: The inner blood–retinal barrier, formed by capillary endothelia, and the outer blood–retinal barrier, formed by the retinal pigment epithelium (RPE) [8]. Because horses have a widely avascular retina [9], the RPE is the crucial part for immune defence of the eye. Under physiological conditions, it ensures that no leukocytes can move in the inner eye [10]. In case of ERU, leukocytes are allowed to transmigrate the outer blood–retinal barrier with subsequent inflammation and destruction of retinal structures [11]. Until now, molecular pathophysiological mechanisms at RPE, which crucially contribute to ERU [12], are not fully understood.

Therefore, the goal of this study was to compare cell surface proteomes of equine RPE cells of healthy and ERU diseased cases by differential proteomic analysis to identify proteins providing more insights into pathophysiology.

2. Material and methods

2.1. RPE specimen

For this study, RPE of a total of 40 eyes was used (21 healthy controls and 19 spontaneous ERU cases). In detail, four healthy and two diseased eyes were used for mass spectrometric identification of proteins. For flow cytometry, RPE cells of five healthy and four diseased eyes were used. With RPE sections of twelve healthy and thirteen diseased eyes, immunohistochemical stainings were performed. Specimens of healthy equine eyes were obtained at a local abattoir, as

well as four ERU diseased eyes. The other uveitic eyes were from horses that had to be enucleated during a therapeutical procedure. Collection and use of equine eyes from animals that were killed due to a research-unrelated cause were approved for purposes of scientific research by the appropriate board of the veterinary inspection office Munich, Germany (Permit number: 8.175.10024.1319.3). No experimental animals were used in this study.

2.2. Sample preparation

Eyes were prepared immediately after collection from the abattoir. First step was to remove the residual periocular tissue carefully with forceps and scissors. Afterwards, the eyes were rinsed in 70% ethanol for 2 min followed by washing in cold phosphate buffered saline (PBS). Then the eyes were stored in sterile Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) until further use. Subsequent steps were conducted under a laminar flow hood with sterile instruments. Eye globes were cut open circumferentially, and anterior parts of the eye, vitreous and neurosensory retina were carefully removed in order to obtain the posterior eyecups for either in-eye biotinylation for mass spectrometry or RPE cell isolation.

2.3. In-eye biotinylation of cell surface proteins

For discovery of differentially expressed plasma cell membrane proteins, six eyecups from three horses were taken for in-eye biotinylation. Two horses showed one diseased eye each and their contralateral healthy eye was taken as control as well as two more healthy eyes from a third horse. Eyecups were washed once with pre-warmed PBS, then cell surface membrane proteins of the RPE were labelled with biotinylation reagent: 20 mM NaIO₄, 100 μM biotin (both Gentaur, Aachen, Germany) and 10 mM aniline (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) in PBS pH 6.7. After shaking slowly in the dark for 30 min at 4 °C and two washing steps, the next step was to scrape the RPE cells carefully into ice cold PBS (pH 7.4 with 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂), transfer them into a tube and centrifuge them at 130 ×g for 5 min. Then the cells were lysed with 1% Nonidet P-40, 1× Roche Complete Protease Inhibitor, EDTA-free (both Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 10 mM Tris-HCl, 5 mM 2-iodoacetamide (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) in 150 mM NaCl pH 7.6. For preparation of integral plasma cell membrane fraction, samples were incubated with high affinity Streptavidin-beads (IBA, Göttingen, Germany) for 2 h at 4 °C on a rotator to capture biotinylated cell surface proteins. Subsequently, extensive washing steps were performed to remove non-specifically bound proteins. Then, proteins were extracted from affinity-purified plasma membrane by digesting beads overnight with trypsin (Promega, Mannheim, Germany) at 37 °C. After centrifugation at 2000 ×g for 2 min, supernatant, containing tryptic peptides, was collected. Afterwards, beads were incubated with glycerol-free PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany) for 5 h at 37 °C to elute glycopeptides. Therefore, supernatant was collected after another centrifugation step at 2000 ×g for 2 min. Finally, peptides of the two fractions were analysed by LC-MS/MS.

2.4. Separation of equine RPE cells for flow cytometry

Posterior eyecups were washed twice with pre-warmed PBS to remove residual vitreous and retinal tissue. For complete removal of retinal tissue, especially the rod outer segments, eyecups were filled with pre-warmed 1 mM PBS/EDTA pH 7.4 and incubated at room temperature (RT) for 15 min. After the removal of the PBS/EDTA solution, RPE cell layer was enzymatically detached by filling the eyecups with pre-warmed dissociation buffer (40 U/ml papain, Carl Roth, Karlsruhe, Germany; 1 mM PBS/EDTA pH 7.4; 260 mM L-cysteine (Sigma Aldrich); 1% bovine serum albumin (BSA, AppliChem, Darmstadt, Germany)) and incubated at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere for 25 min. Then, RPE cells were resuspended in dissociation buffer inside the eyecup. Afterwards, cell suspension was transferred into DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) (both PAN-Biotech) to block the enzymatic activity of papain. The next step was to centrifuge the suspension at 130 ×g for 5 min and wash the RPE cells two times. Pre-warmed PBS was used for all washing steps and centrifugation was performed at 130 ×g for 5 min. Finally, RPE cells were resuspended in DMEM containing 10% FCS and 1% P/S and seeded into T25 cell culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany).

2.5. Preparation for immunohistochemistry

First, posterior eyecups were immersion-fixed with Bouin's solution (Sigma Aldrich). Then they were dehydrated in ascending alcohol series and cut into specific fragments as previously described [13]. Afterwards, tissue blocks were embedded in paraffin and sections of a thickness of 8 μm were produced and set on coated slides (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany).

2.6. Mass spectrometry

Protein identifications of RPE cell surface proteomes were performed by LC-MS/MS mass spectrometry as described [2]. Briefly, digested peptides were loaded automatically to a HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA) equipped with a nanotrap column in 95% buffer A (5% ACN, 0.1% formic acid (FA) in HPLC-grade water) and 5% buffer B (80% ACN, 0.1% FA in HPLC-grade water). After 5 min, the peptides were eluted and separated on the analytical column (75 μm inner diameter × 15 cm, Acclaim PepMap100 C18, 3 μm, 100 Å, Dionex) by a gradient from 5% to 50% of buffer B at 300 nL/min flow over 120 min followed by a gradient from 50% to 100% buffer B in 5 min. The eluting peptides were analysed online in a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled to the HPLC system with a nanospray ion source. The mass spectrometer was operated in the data-dependent mode to automatically switch between Orbitrap-MS and LTQ-MS/MS acquisition. Survey full scan MS spectra (from m/z 200 to 1500) were acquired in the Orbitrap with high-resolution (60,000 full-width half maximum). The method used allowed sequential isolation of the most intense ions (up to ten), depending on signal intensity, for fragmentation on the linear ion trap using collisional induced dissociation at a target value of 100,000 ions. High-resolution MS scans in the Orbitrap and MS/MS scans in

the linear ion trap were performed in parallel. Target peptides already selected for MS/MS were dynamically excluded for 30 s.

2.7. Label-free quantification

LC-MS/MS-derived MS/MS spectra were directly imported as raw files into Progenesis LC-MS software (version 2.5, Nonlinear) and label-free quantification was performed as described before [2]. Briefly, profile data of the MS scans as well as MS/MS spectra were transformed to peak lists with Progenesis LC-MS using a proprietary algorithm and then stored in peak lists comprising m/z and abundance. The most complex sample was set as a reference, and the retention times of all other samples within the experiment were aligned (3 to 5 manual landmarks, followed by automatic alignment) to create maximal overlay of the two-dimensional feature maps. Features with charge scores of one or above 7 were excluded from further analysis. Subsequently, samples were grouped (healthy or ERU, respectively). After analysis with Mascot (Matrix Science, Version 2.2.06; see below) all unique peptides (with Mascot score ≥30 identified at p < 0.01) of an identified protein were summoned for quantification and the total cumulative abundance was calculated by summing the abundances of all peptides allocated to the respective protein. No minimal thresholds were set for the method of peak picking or selection of data to use for quantification.

2.8. Database search and identification criteria

LC-MS/MS-derived MS/MS spectra were analysed using Mascot (Matrix Science, Version 2.2.06). Mascot was set up to search the Ensembl Horse database (EquCab2 assembly: 22641 sequences; 12722273 residues) downloaded from the Ensembl public database (<http://www.ensembl.org/index.html>) setting trypsin as digestion enzyme and allowing fragment ion mass tolerances of 1 Da and parent ion tolerances of 10 ppm. One missed cleavage was allowed and iodoacetamide derivatives of cysteines as stable modifications as well as oxidation of methionine and deamidation of asparagine and glutamine as variable modifications were specified for Mascot searches.

Protein identifications were accepted if the probability based MOWSE protein score was above the 1% significance threshold for the database and contained at least two identified peptides with at least 80.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [14]. Abundances of the identified proteins of healthy and diseased RPE cells were compared and only proteins having a fold change cut-off of 15 were accepted as differentially expressed. Proteins that contained similar peptides but could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Detailed information of all identified proteins was collected and is made available as supporting information (Supplemental Tables 1–3).

2.9. Gene Ontology (GO) and Phobius algorithm

Proteins identified on RPE cell surface by LC-MS/MS were analysed for the presence of transmembrane domains and/or signal peptides for secretion by the Phobius algorithm [15]. In addition, annotation of GO terms “cellular component” was

retrieved from the EMBL-EBI QuickGO database (www.ebi.ac.uk/QuickGO), either directly from the entries in the equine database or by searching orthologue entries in the human database. Proteins annotated with GO terms “extracellular region”, “membrane” and/or “plasma membrane” were considered as being potentially located on the cell surface in addition to those with transmembrane domains or secretion signal peptides (for details see Supplemental Table 3).

2.10. Analysis of equine RPE cells by flow cytometry

Healthy and uveitic equine RPE cells were harvested with Trypsin/EDTA (PAN-Biotech), washed twice with PBS and centrifuged between washing steps at 4 °C, 130 ×g for 5 min. Then cells were seeded in 96 well round-bottom plates with 1×10^5 cells per well. Before cell staining, cells which were selected for staining with rabbit anti-synaptotagmin 1 antibody (Abcam, Cambridge, United Kingdom) and rabbit anti-collectrin antibody (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) had to be treated with permeabilisation solution (Cytoperm; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) for 20 min at 4 °C. After washing with staining buffer, cells were incubated with rabbit anti-synaptotagmin 1 antibody (Abcam; dilution 1:10), mouse anti-basigin antibody (Novus Biologicals, Cambridge, United Kingdom; dilution 1:10) and rabbit anti-collectrin antibody (Santa Cruz; dilution 1:10) diluted in staining buffer for 30 min at 4 °C. After washing with staining buffer, anti-rabbit-IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Darmstadt, Germany; dilution 1:200) or anti-mouse-IgG1 FITC (Santa Cruz; dilution 1:200) labelled antibodies were diluted in staining buffer, added respectively and incubated for 30 min at 4 °C. To confirm that primary antibody binding was specific and did not result of non-specific Fc receptor binding, we used appropriate isotype controls. Measurement of events was performed on FACS Canto II with FACS Diva 6.1.3 software (both BD Biosciences, Heidelberg, Germany). RPE cell populations were gated according to forward scatter (cell size) and side scatter (intercellular granularity) properties. Compensation was performed manually. Between 3000 and 5000 events were measured per staining. Up to 5 independent measurements were performed with up to five healthy and four diseased horses. Mean fluorescent intensity (MFI) of synaptotagmin 1, basigin and collectrin signal in healthy RPE cells was compared with MFI of synaptotagmin 1, basigin and collectrin signal in diseased RPE. Before comparing, MFI of isotype controls were detracted from MFI of synaptotagmin 1, basigin and collectrin stained cells, respectively.

2.11. Immunohistochemistry on RPE sections

Embedded tissue sections were deparaffined with xylene and rehydrated in descending alcohol series. Heat antigen retrieval was performed in EDTA-NaOH as described [15]. Afterwards, sections were blocked with 1% BSA in Tris buffered saline-tween (TBS-T; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2, 0.1% Tween 20) containing 5% appropriate serum (derived from the secondary antibody host animal species) for 40 min at RT to prevent unspecific antibody binding. Sections were first incubated with primary antibodies against synaptotagmin 1 (Abcam; dilution 1:1500), basigin (Novus Biologicals; dilution 1:50) or collectrin (Santa Cruz; dilution 1:50) at 4 °C overnight,

followed by a washing step with TBS-T. Next step was to incubate sections with respective secondary antibodies (anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647 or anti-mouse IgG Alexa Fluor 647, both Invitrogen; dilution: 1:500) for 30 min at RT. Cell nuclei were counter-stained with 4',6 Diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen; dilution: 1:1000). Finally, glass slides were mounted with glass cover slips using Roti Mount Fluor Care (Carl Roth). Fluorescent images were recorded using Axio Imager M1 and Axio Vision 4.8 software (both Zeiss, Göttingen, Germany).

Quantification of fluorescent intensity of 5 healthy and 5 diseased RPE sections for each antibody was performed using open source ImageJ 1.47 software (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). First, integrated density and area of the region of interest (region 1) were measured. Then a region without fluorescence (region 2) was measured for background subtraction. The following formula was used to calculate the corrected total fluorescence (CTF):

$$\text{CTF} = \text{Integrated density of region 1} - (\text{Area of region 1})$$

Mean value was formed from healthy CTFs and set at 100%. Statistical analyses were performed using Kolmogorov–Smirnov test first to determine data distribution. Data are distributed normally, when p-value of Kolmogorov–Smirnov test was ≥ 0.05 . Then Student's t-test was applied for calculation of abundances between ERU cases and controls. By contrast, Kolmogorov–Smirnov test with a p-value of ≤ 0.05 showed that data were not normally distributed. So Mann–Whitney test was used for analysing abundances between disease and controls. Data of statistical analysis, performed by Student's t-test and Mann–Whitney test, were considered as significant with a p-value of ≤ 0.05 .

3. Results

3.1. In ERU, 27 RPE plasma cell membrane proteins change expression

Among 27 differentially expressed cell surface proteins, three were up-regulated (Table 1) and 24 down-regulated (Table 2) in disease. According to GO categorisation and Phobius algorithm, 81.8% of the identified proteins were membrane proteins (highlighted grey in Tables 1 and 2) with functions such as transport, cell adhesion, cell communication and protein binding. Immunoglobulin gamma (IgG) 5, IgG7 and complement C3 were up-regulated in ERU (Table 1). In contrast, the typical RPE marker retinal pigment epithelium-specific protein 65 (RPE65) [16,17] as well as rhodopsin, S-arrestin and peripherin-2 (PRPH2) were down-regulated in ERU cases (Table 2). Further down-regulated proteins were synaptotagmin 1, basigin and collectrin. Synaptotagmin 1, a calcium-ion-sensing protein in synaptic vesicles, was identified as retina cell membrane associated autoantigen in ERU before [18], but not yet detected in RPE cells. Basigin is a widely expressed protein, known to be expressed in the RPE with important functions [19,20]. It was found to be involved in cell adhesion in association with integrin [19]. Furthermore, basigin is required for targeting monocarboxylate transporters (MCT), which are responsible for

transepithelial transport of lactate to the plasma cell membrane [20]. Collectrin, was recently identified for the first time in RPE cells of mice and rats with an age related altered expression [21]. Since there was no knowledge about function and localisation of collectrin in equine RPE cells, we were interested to get more information about it. Hence we decided to further analyse these three very interesting proteins in context of spontaneous uveitis.

3.2. Decreased expression of synaptotagmin-1, basigin and collectrin in uveitic RPE cells proven by flow cytometry

We verified down-regulation of synaptotagmin 1, basigin and collectrin in uveitic RPE cells by analysing expression of respective proteins in primary RPE cells from controls and ERU cases by flow cytometry. Comparison of MFI of positive stained cells in healthy and uveitic RPE revealed a clear reduction of synaptotagmin 1, basigin and collectrin expression in equine RPE cells from ERU cases (Fig. 1). MFI of negative controls was defined as 100% (Fig. 1A, B and C grey columns), in comparison MFI of synaptotagmin 1 staining was reduced to 76.3% (Fig. 1A, black column), MFI of basigin staining was reduced to 54.6% (Fig. 1B, black column) and MFI of collectrin staining was reduced to 73.5% (Fig. 1C, black column) in RPE cells of ERU cases.

3.3. Synaptotagmin 1 is detectable in healthy equine RPE cells and downregulated in uveitic cases

In a previous study, we performed immunohistochemistry to localise synaptotagmin 1 in horse retina and could demonstrate that synaptotagmin 1 is significantly downregulated in retinas of ERU cases [18]. To further characterise this transmembrane protein and since synaptotagmin 1 expression sites in RPE cells have not been described to date, we were now interested in its expression pattern in healthy equine RPE cells. To this end we performed immunohistochemical staining of healthy RPE (Fig. 2A and B). Due to melanin pigment content, differential interference contrast (DIC) image of healthy equine RPE (Fig. 2A) showed RPE monolayer in black. Immunolabelling of synaptotagmin 1 in healthy RPE revealed synaptotagmin 1 expression (red) along the whole RPE monolayer, shown in overview of Fig. 2B. Expression of synaptotagmin 1 in each single cell was disseminated equally. DIC image of uveitic equine RPE showed a still intact RPE morphology (Fig. 2C). Based on physiological expression pattern, we then analysed disease

associated changes in synaptotagmin 1 expression. Therefore, we performed immunohistochemical staining of uveitic RPE, which revealed a reduction of synaptotagmin 1 expression in uveitic RPE (Fig. 2D, synaptotagmin 1 expression: red) compared to healthy controls. Physiological uniform expression of synaptotagmin 1 vanished and localisation of synaptotagmin 1 expression was detectable at margins of RPE cells in uveitis cases (Fig. 2D). By investigation of morphologically still intact RPE cells of ERU diseased animals, downregulation of synaptotagmin 1 was shown to be independent of apparent destruction of expression sites as occurring in advanced stages of ERU.

3.4. Basigin polarises basolateral in healthy equine RPE cells and is downregulated in uveitic equine RPE cells

Basigin, involved in important membrane functions like cell adhesion and lactate transport, is known to be expressed in RPE cells [19,20]. In a previous study, we could detect its expression in plasma cell membrane proteins of healthy equine RPE cells by mass spectrometry [8]. Since basigin expression patterns in united cell structure of equine RPE were not yet described, we performed immunohistochemistry to localise basigin in healthy and diseased equine RPE and further investigate changes during ERU. DIC images of healthy equine RPE (Fig. 3A) and of diseased equine RPE (Fig. 3C) showed both a morphologically intact RPE monolayer. Interestingly, basigin was clearly basolaterally polarised in RPE cells of healthy horses (Fig. 3B, basigin: red). In contrast, equine RPE cells of uveitic cases (Fig. 3D) had significantly reduced basigin expression. Remarkably, residual expression was then found basolateral, as well as apical (Fig. 3D). In advanced stages of disease, expression of basigin almost disappeared. Similar to analyses of synaptotagmin 1 expression, we investigated still morphologically intact RPE of ERU cases, showing that basigin downregulation was also independent of destruction of expression sites in ERU.

3.5. Collectrin expression decreased to basolateral remnants in uveitic RPE

Recently, collectrin was found to be basolaterally and apically expressed in RPE cells of mice [21]. Since there is no knowledge about its localisation and function in RPE of other species to date, we performed immunohistochemical stainings to examine its localisation in healthy equine RPE and to detect ERU associated changes in diseased equine RPE. DIC images showed representative intact RPE monolayer of healthy (Fig. 4A) and

Table 1 – Increased expression of plasma cell membrane proteins (highlighted grey) in RPE cells from ERU diseased horses in comparison to controls. Plasma cell membrane proteins were enriched by *in situ* biotinylation and subsequently identified by mass spectrometry (LC-MS/MS). Proteins listed have a ERU/control ratio ≥ 15 .

	Ensembl accession ^a	Confidence score ^b	Protein ^c	Ratio ^d
1	ENSECAP00000005371	402	Immunoglobulin gamma 7	21.3
2	ENSECAP00000016864	233	Complement C3	18.2
3	ENSECAP00000007455	208	Immunoglobulin gamma 5	16.9

^aAccession number of identified protein as listed in Ensembl protein database (<http://www.ensembl.org>); ^bconfidence score >30 was required for a protein to be considered as identified in Ensembl protein database; ^cname of identified protein; ^dproteins listed have a ERU/control ratio ≥ 15 .

Table 2 – Diminished expression of plasma cell membrane proteins (highlighted grey) in RPE cells from ERU diseased horses in comparison to controls. Plasma cell membrane proteins were enriched by *in situ* biotinylation and subsequently identified by mass spectrometry (LC-MS/MS). Proteins listed have a control/ERU ratio ≥ 15 .

	Ensembl accession ^a	Confidence score ^b	Protein ^c	Ratio ^d
1	ENSECAP000000010130	740	Basigin	173.8
2	ENSECAP000000019509	208	Apolipoprotein D	173.3
3	ENSECAP000000015566	237	Na/K ATPase beta1	171.9
4	ENSECAP000000017054	162	Collectrin	133.5
5	ENSECAP000000016644	252	Milk fat globule EGF factor 8 protein	85.6
6	ENSECAP000000000404	477	Glucose transporter type 4	77.9
7	ENSECAP000000012774	196	Alpha-2-HS-glycoprotein	74.9
8	ENSECAP000000012776	128	S-arrestin	65.8
9	ENSECAP000000020923	108	Chondroitin sulfate proteoglycan 5	62.8
10	ENSECAP000000008636	152	CD44	61.1
11	ENSECAP000000008347	112	RPE65; retinoid isomerohydrolase	59.5
12	ENSECAP000000005097	83	Glycoprotein M6B	43.9
13	ENSECAP000000012953	84	Mitochondrial phosphate carrier protein	36.6
14	ENSECAP000000010875	93	Synaptotagmin-1	32.8
15	ENSECAP000000005579	158	Neurotrimin	28.4
16	ENSECAP000000006084	473	Na/K ATPase beta2	27.3
17	ENSECAP000000011187	340	Sodium/potassium/calcium exchanger 1	25.2
18	ENSECAP000000011418	131	ADP/ATP translocase 2	24.9
19	ENSECAP000000016308	280	Guanine nucleotide binding protein, alpha	23.3
20	ENSECAP000000011492	211	Rhodopsin	22.5
21	ENSECAP000000020738	334	Malate dehydrogenase	20.0
22	ENSECAP000000012525	121	Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 2	19.8
23	ENSECAP000000014764	329	Peripherin 2	18.4
24	ENSECAP000000014508	67	Glycoprotein M6A	15.9

^aAccession number of identified protein as listed in Ensembl protein database (<http://www.ensembl.org>); ^bconfidence score >30 was required for a protein to be considered as identified in Ensembl protein database; ^cname of identified protein; ^dproteins listed have a control/ERU ratio ≥ 15 .

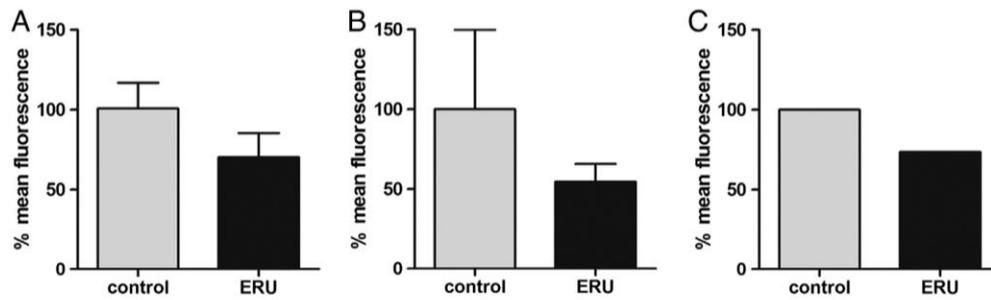


Fig. 1 – Mean fluorescent intensity of synaptotagmin 1 (A), basigin (B) and collectrin (C) at healthy equine RPE cells (grey column) compared to RPE cells of spontaneous ERU cases (black column), analysed by flow cytometry.

diseased (Fig. 4C) horses. In healthy equine RPE, collectrin was expressed over the whole cell, but mainly polarised to basal, apical and lateral region (Fig. 4B, collectrin: red). Immunohistochemical staining of RPE of diseased horses revealed a significant reduction of collectrin and a polarisation shift towards basolateral side (Fig. 4D). In order to exclude correlation of increased collectrin expression with destruction of diseased RPE cells in advanced stages of ERU, we only investigated morphologically still intact RPE of ERU cases.

3.6. Synaptotagmin 1, basigin and collectrin expression were significantly reduced in uveitic equine RPE sections

All healthy and diseased equine RPE sections stained for synaptotagmin 1, basigin and collectrin revealed an expression

pattern comparable to representative examples shown in Fig. 2, 3 and 4. To quantify expression of these three proteins, fluorescent intensities of healthy and uveitic RPE sections were measured (Fig. 5). Fluorescent intensity of synaptotagmin 1 of uveitic RPE cells was significantly reduced to 63.5% (Fig. 5A, black column; * = $p \leq 0.05$, standard deviation (SD): 10.1%) of healthy controls (Fig. 5A, grey column). An even more significant reduction to 28.4% (Fig. 5B, black column; ** = $p \leq 0.01$, SD: 0.9%) in RPE cells of diseased horses was detectable for basigin compared to healthy controls (Fig. 5B, grey column). Decrease of fluorescence intensity of collectrin in uveitic RPE cells was also highly significant. Intensity was reduced to 50.0% (Fig. 5C, black column; ** = $p \leq 0.01$, SD: 4.6%) of physiological expression (Fig. 5D, grey column).

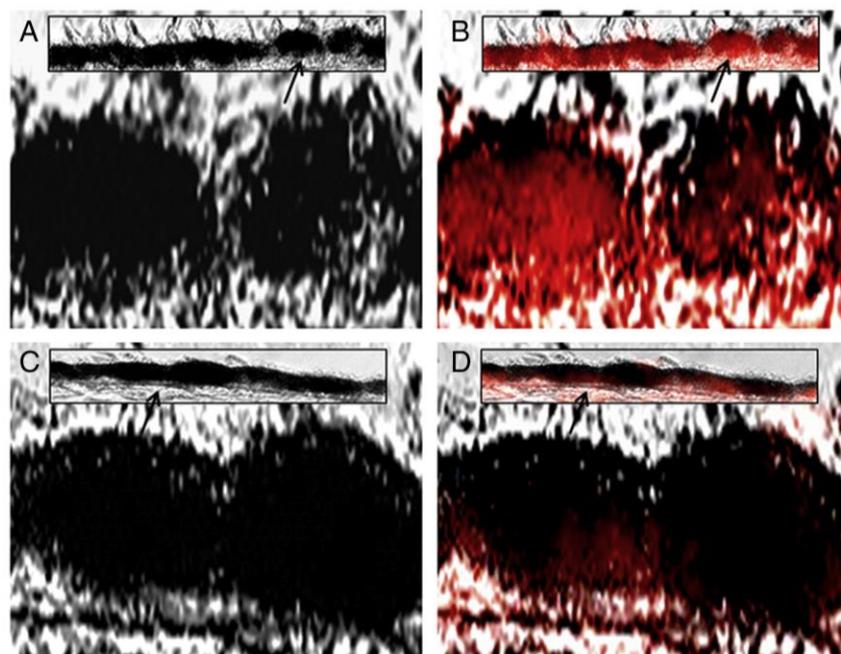


Fig. 2 – Synaptotagmin 1 expression (red) in healthy and ERU diseased RPE. A part (arrows) of a longer RPE section was enlarged. (A) Differential interference contrast image of healthy equine RPE. (B) Equally disseminated expression pattern of synaptotagmin 1 (red) in healthy equine RPE cells. (C) Differential interference contrast image of diseased equine RPE. (D) Reduced synaptotagmin 1 expression (red) in diseased equine RPE (synaptotagmin 1 expression = red).

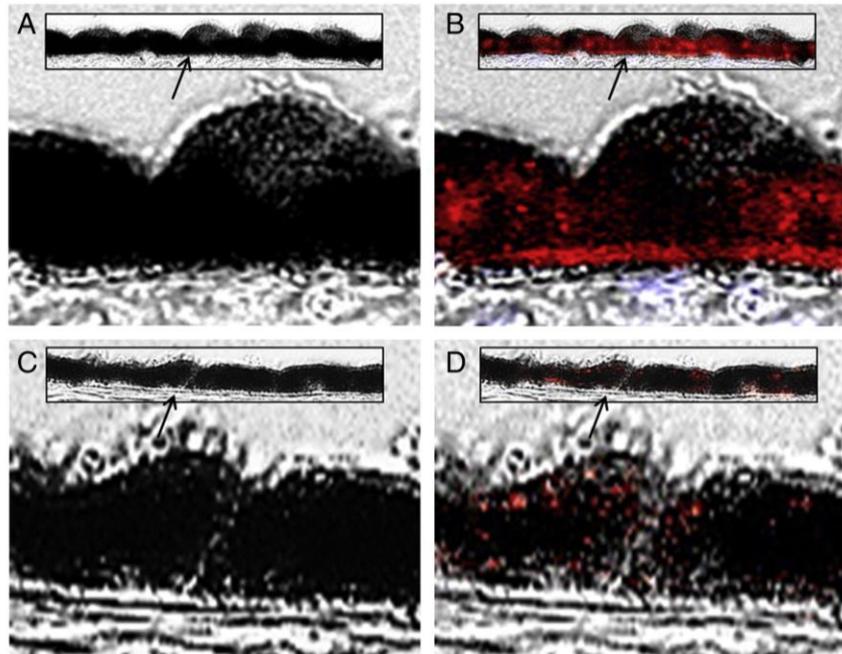


Fig. 3 – Basigin expression (red) in healthy and ERU diseased RPE. A part (arrows) of a longer RPE section was enlarged. (A) Differential interference contrast image of healthy equine RPE. (B) Basolateral expression of basigin (red) in healthy equine RPE. (C) Differential interference contrast image of diseased equine RPE. (D) Reduced basigin expression (red) in diseased equine RPE.

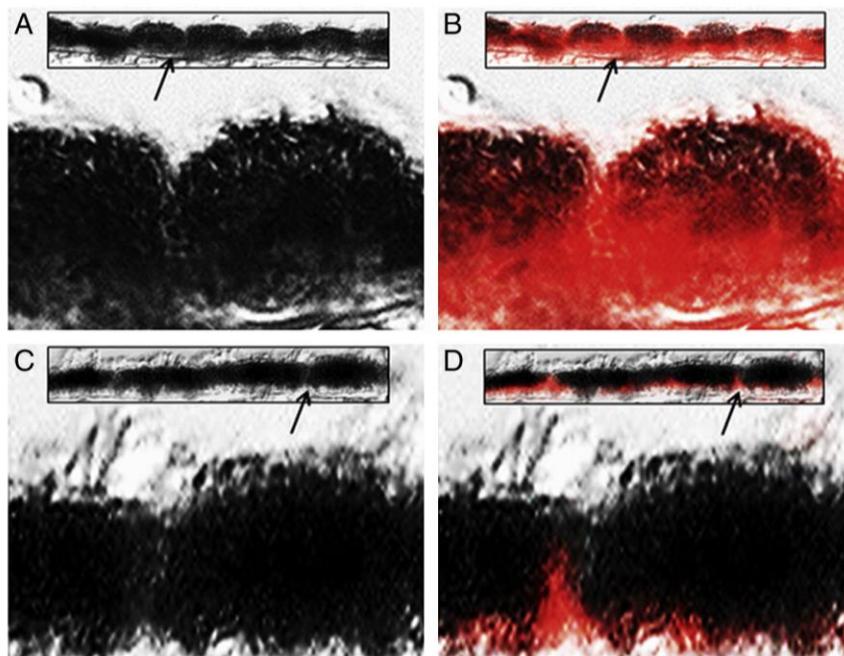


Fig. 4 – Collectrin expression (red) in healthy and ERU diseased RPE. A part (arrows) of a longer RPE section was enlarged. (A) Differential interference contrast image of healthy equine RPE. (B) Expression of collectrin (red) in healthy equine RPE over the whole cell with an increased basal, apical and lateral polarisation. (C) Differential interference contrast image of diseased equine RPE. (D) Reduced basolateral expression of collectrin (red) in diseased equine RPE.

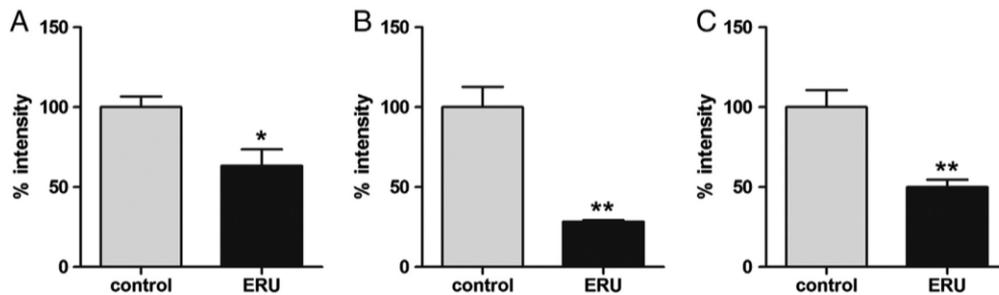


Fig. 5 – Quantification of fluorescent intensity of synaptotagmin 1 (A), basigin (B) and collectrin (C) using immunohistochemistry on RPE of healthy (grey column) and diseased horses (black column). Significant reduction of synaptotagmin 1, basigin and collectrin in RPE cells of ERU diseased horses compared to RPE cells of negative controls (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$).

4. Discussion

Located between the photoreceptor layer of the retina and the choroid layer, the RPE builds the outer blood–retinal barrier of the eye and plays an important role in retinal functions: Absorption of light, protection against oxidative stress, transport of nutrients and phagocytosis of waste products from photoreceptor cells [22]. A further important function of blood–retinal barrier is immune defence of the inner eye. Defects in RPE-specific functions and changes in its protein expression pattern were associated with a number of ocular diseases [23]. Because one typical feature of ERU is breakdown of blood–retinal barrier [11], it is necessary to understand the pathomechanisms leading to this breakdown.

Therefore, in this study we performed differential proteome analysis of cell surface membrane proteomes of healthy equine RPE compared to diseased ones. A total of 27 differentially expressed plasma cell membrane proteins could be detected. With a share of 81.8%, the majority of the identified proteins were membrane proteins, thus, we succeeded in the enrichment of cell surface membrane proteins by *in situ* biotinylation.

In a previous study, we compared cell surface membrane proteomes of isolated native and cultured healthy equine RPE cells [8]. Thereby, we showed that there is a profound re-organisation of cultured equine RPE cells compared to native equine RPE cells [8]. Due to major changes of *in vivo* to *in vitro* conditions, only 45% of cell surface proteins that were expressed in native cells still appeared in cultured cells [8]. In addition, cell surface membrane proteome of cultured equine RPE cells adapts to *in vitro* situation by re-organising its expression of cell surface membrane proteins mainly towards proteins with functions like cell adhesion and cell communication [8]. This re-organisation effect of cultured cells, affecting their suitability as experimental model, was also shown by comparing the whole proteome of cultured human RPE cells and native human RPE cells by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) in combination with matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry [17]. Hence, to gain representative results for proteomes appropriate to those in actual physiological and pathophysiological *in vivo* processes, it is necessary to investigate

proteomes of *in situ* or uncultured native cells. Therefore, performing for the first time *in situ* biotinylation of RPE cells followed by LC–MS/MS enabled us to present an effective and successful method to identify differentially expressed plasma cell membrane proteins of uveitic equine RPE cells without cell culture dependant changes of these cells. Thereby, new insights in pathophysiological processes of plasma cell membrane proteins of RPE in ERU were achieved.

Since ERU is the only spontaneous animal model for autoimmune uveitis in man [24], this substantial progress in investigating pathomechanisms involving the RPE is becoming even more relevant. ERU and autoimmune uveitis in man share many similarities in clinical presentation, course of disease and autoimmune reactions [11,24,25]. All eyes of uveitis cases investigated in this study were obtained from individual horses with spontaneous recurrent uveitis, an out-bred genetic background and exposed to all typical environmental conditions, thus making our samples an ideal model for human uveitic eyes.

Using our novel technique, we detected a total of 27 differentially expressed plasma cell membrane proteins, including typical RPE proteins like RPE65, basigin, cytokeratin, transferrin, S-arrestin and rhodopsin. These proteins were also detected in the plasma cell membrane of human primary RPE cells [26]. Proteome of these human primary RPE cells was sub-classified in cytosolic, microsomal and membrane fractions and analysed by 1D and 2D PAGE followed by MALDI TOF/TOF and LC–MS/MS [26]. Thereby 52 plasma cell membrane proteins were detected [26].

We are first to investigate differentially expressed proteins of RPE cells in uveitis. Thereby, we detected proteins which were already found in association with ERU by our research group before: Rhodopsin belongs to the G-protein coupled receptor family and is very important for light detection [27]. In present study, rhodopsin was found to be downregulated in uveitic RPE (Table 2) which corresponds with rhodopsin expression in retina, where rhodopsin was also downregulated at photoreceptors in case of ERU [12]. In this study, we also found S-arrestin to be downregulated in RPE cells of ERU cases (Table 2). Interestingly, we have shown earlier that immunisation of horses with S-arrestin, also known as S-antigen, can induce severe uveitis in the horse with total ablation of retina and complete destruction of outer blood retinal barrier [28] and that expression

of S-arrestin is constantly detectable in all stages of ERU and slightly increased in uveitic retina compared to retina of healthy horses [12]. Another protein with known function in ERU, also identified in this study, was complement C3. We found complement C3 to be upregulated in uveitic RPE (Table 1). This is in accordance with other studies from our group, where we found activator complement B and split products (C3b, iC3b and C3d) of complement C3 increased in uveitic vitreous, sera, retina and infiltrating leukocytes [6,29,30]. Two more proteins were identified upregulated in uveitic RPE in this study, IgG5 and IgG7 (Table 1). It is known that horses express seven IgG-isotypes, IgG1 to IgG7 [31], but there is still a need to get more information about their unique functions. Remarkably, in previous studies we already detected higher expression of IgG isotypes, including IgG7, in uveitic sera, vitreous and retina [32–35]. ERU is an autoimmune disease mainly mediated by CD4⁺ type 1 (Th1) cells [33,36]. So far, convincing functional data for Ig isotypes in horses could not be generated because of a lack of isotype specific antibodies [31]. Therefore, we just finished producing our own monoclonal horse IgG specific isotype antibodies and after their characterisation, we can use these tools to get more information about the functions of IgG5 and IgG7 in spontaneous ERU.

In RPE cells, most of the detected candidates were not described in uveitis-associated changes so far, although we identified several proteins, which were already related to other ocular diseases. One of these proteins was PRPH2, a structural glycoprotein, which is essential for photoreceptor outer segment formation [37]. We identified PRPH2 as downregulated in uveitic RPE (Table 2). Remarkably, changes in PRPH2 expression and PRPH2 mutation are commonly associated with retinal degenerative diseases, like retinitis pigmentosa, an inherited and degenerative eye disease [38]. It was shown, that PRPH2 knock-out mice were affected by retinal degeneration [37]. In contrast, PRPH2 was found to be upregulated in primary bovine RPE cells of passage 2 [39]. These bovine RPE cells were exposed to oxidative stress (probably involved in pathophysiological processes in degenerative ocular diseases like age related macular degeneration (AMD)) and analysed in comparison to controls by 2D difference gel electrophoresis (DIGE) followed by MALDI TOF/TOF mass spectrometry. The meaning of downregulation of PRPH2 in RPE of spontaneous ERU cases remains to be determined.

For the first time, we found RPE65 downregulated in RPE cells of spontaneous uveitis (Table 2). RPE65 is a RPE cell specific protein and the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle, catalysing conversion of all-trans-retinyl ester to 11-cis-retinol [40]. It is known, that RPE65 disappears immediately in cultured cells and that it is absent in most RPE cell lines, except in human RPE cell line ARPE19 [8,17,41,42]. Hence, RPE65 is used as marker for uncultured native cells. Because in the present study we used *in situ* prepared native RPE cells, we can exclude culture-related changes as explanation for this finding. Thus our results strongly suggest that the detected downregulation of RPE65 in uveitic RPE cells is solely due to the disease. Decreased expression of RPE65 was also found in ARPE19 cells, which were treated with t-butyl hydroperoxide or hydrogen peroxide to induce oxidative stress with further measurement of mRNA expression by northern blot [43]. Finding of RPE65, absent in cultured RPE

cells, among our differentially regulated candidates further underscores the importance of our approach.

Most importantly, in this study we detected and further characterised a significant downregulation of synaptotagmin 1 in ERU (Table 2). Synaptotagmin 1 is a N-glycosylated trans-membrane protein with two C2 domains, sensitive for Ca²⁺ and thereby initiating the fusion of vesicle membranes with cell membranes, which is important for endocytosis and exocytosis processes [44,45]. It was shown to be located in neurons of brain and glia cells of humans, rats and mice [46] and also in retinae of horses [18]. Synaptotagmin 1 expression pattern in RPE cells was not described to date. In this study, we identified synaptotagmin 1 to be expressed in equine RPE cells. Synaptotagmin 1 expression in healthy RPE was disseminated equally over the whole cell (Fig. 2B). In uveitic RPE cells, synaptotagmin 1 expression was significantly reduced to 63.5% (Fig. 2D and Fig. 5A, black column). In a previous study, we identified synaptotagmin 1 as an autoantigen in ERU [18]. In addition, decreased synaptotagmin 1 expression in retinae of diseased horses was shown [18]. One reason for downregulation of synaptotagmin 1 in RPE cells and retinae of ERU cases could be the autoimmune attack directed against synaptotagmin 1. Up to now, function of synaptotagmin 1 in RPE cells and relevance of altered synaptotagmin 1 expression in disease are still unknown. Interestingly, it was shown, that decrease or loss of synaptotagmin family members is related to diseases with inflammatory degeneration like Alzheimer's disease [47]. Further investigations are necessary to gain more information about synaptotagmin 1 functions in RPE cells and how they are involved in pathophysiological processes at outer blood retinal barrier of uveitis.

Another functionally very interesting protein with lower expression levels in RPE cells of ERU cases was basigin (Table 2). Basigin is part of the IgG superfamily and is a widely expressed glycoprotein [48]. There are different described polarities of basigin in RPE cells. For example, in human, mice and chicken RPE, basigin was found to be polarised basolaterally and apically [49], whereas it is polarised only apically in rat RPE [50]. Interestingly, we found basigin in equine RPE cells to be polarised basolaterally (Fig. 3B). The interesting finding, that basigin localisation in RPE cells of horses differs from most other species examined so far, might correlate with the fact that horses have a widely avascular retina, so that proteins with important functions like transport of substances to or out of vessels are directed rather towards the basolateral side next to the choroid than to the avascular apical side. In case of ERU, basolateral polarity vanished (Fig. 3D) and basigin expression was significantly reduced to 28.4% (Fig. 5B, black column). Important functions of basigin, which may also play a role in pathophysiological processes of uveitis, were detected by other research groups. For example, when associated with integrins, basigin was suggested to be involved in cell to cell adhesions in a model of human malignant melanoma cells [19]. Thereby, downregulation of basigin in ERU could lead to disruptions of RPE cell-cell junctions, followed by increased permeability of outer blood-retinal barrier and an influx of autoaggressive leukocytes into the inner eye. To which extent basigin is associated with integrins in RPE cells has to be clarified. Furthermore, it was shown that knock out of basigin in mice leads to impaired vision [51]. Basigin^{-/-} mice showed deficiencies in contrast and colour

vision and with increasing age a decrease of length of outer segment and outer nuclear layers of retina [51]. This loss of vision of basigin^{-/-} mice was associated with contribution of basigin to the alignment of monocarboxylate transporters to the plasma membrane of RPE cells, ensuring the transepithelial transport of lactate [20]. But in these basigin^{-/-} mice, no changes of RPE cells were detected [20]. Until now, we are not sure which functional relevance reduction of basigin has in ERU. One possibility is that reduced expression of basigin in RPE of diseased horses leads to lactate imbalances resulting in energy depletion, loss of function and finally degeneration of photoreceptors. Examining lactate transport mechanisms in RPE cells could gain better knowledge about the role of basigin in ERU. Therefore a next step could be to investigate the lactate transport from the photoreceptor side to the choroidal side through a basigin transfected RPE monolayer grown on a polycarbonate filter.

A further protein we identified as downregulated and further characterised in spontaneous uveitis was collectrin (Table 2). Collectrin was first detected as a collecting duct-specific glycoprotein in kidney [52]. It is further known to be expressed in proximal tubules of the kidney [53] and in pancreatic β -cells [54]. Not long ago, collectrin was for the first time described in RPE cells [21]. It was detected in native uncultured RPE cells of rats and found to be basolaterally and apically polarised in murine RPE sections [21]. Thereby, molecular weight changes of collectrin during RPE ageing were detected by 1D PAGE and LC-MS/MS [21]. In this study, we showed for the first time collectrin expression and localisation in equine RPE and its downregulation in spontaneous uveitis (Fig. 4). Collectrin was located over the whole cell in healthy equine RPE with an increased polarisation to basal, apical and lateral side (Fig. 4B). In diseased RPE, collectrin was significantly reduced to 50% (Fig. 5C, black column) of expression in healthy RPE and only found on the basolateral side (Fig. 4D). Pathophysiological relevance of reduction and changes in the expression pattern of collectrin in uveitic RPE is still unknown. In studies regarding AMD, the research group, which found age related molecular weight changes of collectrin in rat RPE, assumed collectrin to be involved in RPE amino acid transports [21]. This correlation of collectrin with amino acid transport was also detected in collectrin^{-/-} mice [55]. A L-arginine uptake assay, performed with pulmonary endothelial cells of collectrin^{-/-} mice, showed dysregulation of L-arginine transport, which leads to higher superoxide levels resulting in hypertension, increased salt sensitivity and decreased pressure natriuresis response [55]. Furthermore, collectrin was associated with secretion of insulin and pancreatic β -cell proliferation [54,56], for example it was shown that overexpression of collectrin in β -cells of transgenic mice and in rat insulinoma cells enhanced insulin secretion [54].

Since there is still no knowledge to what extent the reduction of collectrin impacts equine uveitic RPE and also functional relevance of synaptotagmin 1 and basigin in ERU is still unknown, further investigations will be needed to clarify the physiological and pathophysiological significance of synaptotagmin 1, basigin, collectrin and other candidate proteins in uveitis.

Although suitable diseased eyes for discovery experiment were very difficult to obtain and we therefore had to start

with a small number of diseased specimen in mass spectrometry, we were able to verify the downregulation of our three candidates with an appropriate number of samples in two more techniques and confirmed their statistical significance by quantification immunohistochemical stainings. Even if the methods used for validation are not directly reflected the *in situ* situation of the discovery experiment (because of using cultivated equine RPE cells for flow cytometry and because no difference between cell surface expression and total cellular candidate expression pattern could be detected by immunohistochemistry), they confirm clearly downregulation, detected by mass spectrometry of synaptotagmin 1, basigin and collectrin.

Therefore, our novel proteomic approach proved to be a successful method to detect differentially expressed plasma cell membrane proteins of uveitic RPE cells and we set a foundation to identify plasma cell membrane proteins of many other cell types closely to their physiological appearance *in vivo*.

5. Conclusion

In this study we present a convenient, effective and innovative method which enabled us to identify changed plasma cell membrane proteins in a spontaneous inflammatory eye disease, very close to their appearance in physiological and pathophysiological *in vivo* processes. Therefore we performed for the first time *in situ* biotinylation of healthy and diseased equine RPE cells with successful enrichment of plasma cell membrane proteins analysed by LC-MS/MS. Hence, we were able to identify proteins with altered expression in case of ERU, which might be crucially involved in the pathomechanisms of uveitis.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.020>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgement

The authors would like to thank Olaf Strauss, Kristina Fröhlich and Nina Burkhardt for critical discussions.

REFERENCES

- [1] Olaya-Abril A, Jimenez-Munguia I, Gomez-Gascon L, Rodriguez-Ortega MJ. Surfomics: shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. *J Proteome* 2014;97:164–76.
- [2] Hauck SM, Dieter J, Kramer RL, Hofmaier F, Zipplies JK, Amann B, et al. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:2292–305.

- [3] Stevens TJ, Arkin IT. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* 2000;39:417–20.
- [4] Wu CC, Yates III JR. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol* 2003;21:262–7.
- [5] Macher BA, Yen TY. Proteins at membrane surfaces — a review of approaches. *Mol Biosyst* 2007;3:705–13.
- [6] Hauck SM, Hofmaier F, Dietter J, Swadzba ME, Blindert M, Amann B, et al. Label-free LC–MS/MS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteome* 2012;75:4545–54.
- [7] Degroote RL, Hauck SM, Treutlein G, Amann B, Frohlich KJ, Kremmer E, et al. Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 2013;12:5812–9.
- [8] Szober CM, Hauck SM, Euler KN, Frohlich KJ, Alge-Priglinger C, Ueffing M, et al. Profound re-organization of cell surface proteome in equine retinal pigment epithelial cells in response to in vitro culturing. *Int J Mol Sci* 2012;13:14053–72.
- [9] De Schaepdrijver L, Simoens P, Lauwers H, De Geest JP. Retinal vascular patterns in domestic animals. *Res Vet Sci* 1989;47:34–42.
- [10] Deeg CA, Thurau SR, Gerhards H, Ehrenhofer M, Wildner G, Kaspers B. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* 2002;32:2598–606.
- [11] Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 2002;75:127–33.
- [12] Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Kremmer E, Stangassinger M, Ueffing M. Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol* 2007;44:3291–6.
- [13] Ehrenhofer MG, Deeg CA, Reese S, Liebich HG, Stangassinger M, Kaspers B. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol* 2002;5:39–47.
- [14] Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 2002;74:5383–92.
- [15] Deeg CA, Eberhardt C, Hofmaier F, Amann B, Hauck SM. Osteopontin and fibronectin levels are decreased in vitreous of autoimmune uveitis and retinal expression of both proteins indicates ECM re-modeling. *PLoS ONE* 2011;6:e27674.
- [16] Diniz B, Thomas P, Thomas B, Ribeiro R, Hu Y, Brant R, et al. Subretinal implantation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells: improved survival when implanted as a monolayer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5087–96.
- [17] Alge CS, Suppmann S, Priglinger SG, Neubauer AS, May CA, Hauck S, et al. Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3629–41.
- [18] Swadzba ME, Hauck SM, Naim HY, Amann B, Deeg CA. Retinal glycoprotein enrichment by concanavalin A enabled identification of novel membrane autoantigen synaptotagmin-1 in equine recurrent uveitis. *PLoS ONE* 2012;7:e50929.
- [19] Nishibaba R, Higashi Y, Su J, Furukawa T, Kawai K, Kanekura T. CD147-targeting siRNA inhibits cell-matrix adhesion of human malignant melanoma cells by phosphorylating focal adhesion kinase. *J Dermatol* 2012;39:63–7.
- [20] Philp NJ, Wang D, Yoon H, Hjelmeland LM. Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1716–21.
- [21] Gu X, Neric NJ, Crabb JS, Crabb JW, Bhattacharya SK, Rayborn ME, et al. Age-related changes in the retinal pigment epithelium (RPE). *PLoS ONE* 2012;7:e38673.
- [22] Kay P, Yang YC, Paraoan L. Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration. *J Cell Mol Med* 2013;17:833–43.
- [23] Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res* 2006;5:862–78.
- [24] Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, et al. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:1462–70.
- [25] Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, et al. Equine recurrent uveitis — a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* 2008;40:151–3.
- [26] West KA, Yan L, Shadrach K, Sun J, Hasan A, Miyagi M, et al. Protein database, human retinal pigment epithelium. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:37–49.
- [27] Maeda R, Hiroshima M, Yamashita T, Wada A, Nishimura S, Sako Y, et al. Single-molecule observation of the ligand-induced population shift of rhodopsin, a G-protein-coupled receptor. *Biophys J* 2014;106:915–24.
- [28] Deeg CA, Reese S, Gerhards H, Wildner G, Kaspers B. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2286–92.
- [29] Zipplies JK, Kirschfink M, Amann B, Hauck SM, Stangassinger M, Deeg CA. Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology* 2010;215:949–55.
- [30] Zipplies JK, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, van der Meijden GH, Stangassinger M, et al. Kininogen in autoimmune uveitis: decrease in peripheral blood stream versus increase in target tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:375–82.
- [31] Wagner B. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol* 2006;30:155–64.
- [32] Zipplies JK, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Ueffing M, et al. Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 2009;8:992–8.
- [33] Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thurau SR, Wollanke B, Wildner G. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:393–8.
- [34] Deeg CA, Altmann F, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, et al. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitis lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood–retinal barrier. *Proteomics* 2007;7:1540–8.
- [35] Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Gerhards H, Ueffing M, et al. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 2007;6:2121–31.
- [36] Gilger BC, Malok E, Cutter KV, Stewart T, Horohov DW, Allen JB. Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71:17–28.
- [37] Schlichtenbrede FC, da Cruz L, Stephens C, Smith AJ, Georgiadis A, Thrasher AJ, et al. Long-term evaluation of retinal function in Prph2Rd2/Rd2 mice following AAV-mediated gene replacement therapy. *J Gene Med* 2003;5:757–64.
- [38] de Sousa Dias M, Herman I, Pascual B, Borrás E, Mane B, Gamundi MJ, et al. Detection of novel mutations that cause autosomal dominant retinitis pigmentosa in candidate genes by long-range PCR amplification and next-generation sequencing. *Mol Vis* 2013;19:654–64.

- [39] Arnouk H, Lee H, Zhang R, Chung H, Hunt RC, Jahng WJ. Early biosignature of oxidative stress in the retinal pigment epithelium. *J Proteome* 2011;74:254–61.
- [40] Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12413–8.
- [41] Ahmado A, Carr AJ, Vugler AA, Semo M, Gias C, Lawrence JM, et al. Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7148–59.
- [42] Milyushina LA, Verdiev BI, Kuznetsova AV, Aleksandrova MA. Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human in vitro. *Bull Exp Biol Med* 2012;153:157–62.
- [43] Alizadeh M, Wada M, Gelfman CM, Handa JT, Hjelmeland LM. Downregulation of differentiation specific gene expression by oxidative stress in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2706–13.
- [44] Cordeiro JM, Boda B, Goncalves PP, Dunant Y. Synaptotagmin 1 is required for vesicular Ca²⁺(+)/H⁺(+)-antiport activity. *J Neurochem* 2013;126:37–46.
- [45] Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW. Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo. *Nature* 2003;426:559–63.
- [46] Glavan G, Schliebs R, Zivin M. Synaptotagmins in neurodegeneration. *Anat Rec* 2009;292:1849–62.
- [47] Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell Jr W, et al. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis* 2005;7:103–17 [discussion 73–80].
- [48] Pablo KA, Ochrietor JD. Deletion of the basigin gene results in reduced mitochondria in the neural retina. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;438:546–50.
- [49] Philp NJ, Ochrietor JD, Rudoy C, Muramatsu T, Linser PJ. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1305–11.
- [50] Marmorstein AD, Gan YC, Bonilha VL, Finnemann SC, Csaky KG, Rodriguez-Boulan E. Apical polarity of N-CAM and EMMPRIN in retinal pigment epithelium resulting from suppression of basolateral signal recognition. *J Cell Biol* 1998;142:697–710.
- [51] Hori K, Katayama N, Kachi S, Kondo M, Kadomatsu K, Usukura J, et al. Retinal dysfunction in basigin deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3128–33.
- [52] Zhang H, Wada J, Hida K, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Shikata K, et al. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem* 2001;276:17132–9.
- [53] Danilczyk U, Sarao R, Remy C, Benabbas C, Stange G, Richter A, et al. Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature* 2006;444:1088–91.
- [54] Fukui K, Yang Q, Gao Y, Takahashi N, Hatakeyama H, Wang H, et al. The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab* 2005;2:373–84.
- [55] Cechova S, Zeng Q, Billaud M, Mutchler S, Rudy GK, Straub AC, et al. Loss of collectrin, an angiotensin-converting enzyme 2 homolog, uncouples endothelial nitric oxide synthase and causes hypertension and vascular dysfunction. *Circulation* 2013;128:1770–80.
- [56] Pepaj M, Gjerlaugsen N, Julien K, Thorsby PM. Tmem27 is upregulated by vitamin D in INS-1 cells and its serum concentrations are low in patients with autoimmune diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 2014;74:358–65.

4 PUBLIKATION II

Titel

“Novel Localization of Peripherin 2, the Photoreceptor-Specific Retinal Degeneration Slow Protein, in Retinal Pigment Epithelium”

Autoren

Patrizia B. Uhl, Barbara Amann, Stefanie M. Hauck und Cornelia A. Deeg

Journal

International Journal of Molecular Sciences

Status

Publiziert.

Int J Mol Sci. 2015 Jan 26;16(2):2678-92. doi: 10.3390/ijms16022678.

<http://www.mdpi.com/1422-0067/16/2/2678>

Article

Novel Localization of Peripherin 2, the Photoreceptor-Specific Retinal Degeneration Slow Protein, in Retinal Pigment Epithelium

Patrizia B. Uhl¹, **Barbara Amann**¹, **Stefanie M. Hauck**² and **Cornelia A. Deeg**^{1,*}

¹ Institute for Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-University, Veterinärstraße 13, D-80539 Munich, Germany; E-Mails: p.uhl@tiph.vetmed.uni-muenchen.de (P.B.U.); baerbl.amann@tiph.vetmed.uni-muenchen.de (B.A.)

² Research Unit for Protein Science, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health GmbH, Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg, Germany; E-Mail: hauck@helmholtz-muenchen.de

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de; Tel.: +49-89-2180-1630; Fax: +49-89-2180-2554.

Academic Editor: Johannes Haybaeck

Received: 5 December 2014 / Accepted: 22 January 2015 / Published: 26 January 2015

Abstract: Retinal pigment epithelium (RPE) builds the outer blood-retinal barrier of the eye. Since one typical feature of the autoimmune disease, equine recurrent uveitis (ERU), is the breakdown of this barrier, we recently performed comparative analysis of healthy and uveitic RPE. We identified for the first time peripherin 2, which is responsible for visual perception and retina development, to be localized in RPE. The purpose of this study was therefore to validate our findings by characterizing the expression patterns of peripherin 2 in RPE and retina. We also investigated whether peripherin 2 expression changes in ERU and if it is expressed by the RPE itself. Via immunohistochemistry, significant downregulation of peripherin 2 in uveitic RPE compared to the control was detectable, but there was no difference in healthy and uveitic retina. A further interesting finding was the clear distinction between peripherin 2 and the phagocytosis marker, rhodopsin, in healthy RPE. In conclusion, changes in the expression pattern of peripherin 2 selectively affect RPE, but not retina, in ERU. Moreover, peripherin 2 is clearly detectable in healthy RPE due to both phagocytosis and the expression by the RPE cells themselves.

Our novel findings are very promising for better understanding the molecular mechanisms taking place on RPE in uveitis.

Keywords: peripherin 2; retinal pigment epithelium; retina; rhodopsin; uveitis

1. Introduction

Autoimmune uveitis is a sight-threatening disease mediated by autoreactive T-cells that cross the blood-retinal barrier with subsequent inflammation of the inner eye and destruction of retinal structures [1]. Until now, molecular mechanisms of pathophysiology leading to the loss of the immune-privilege of the inner eye are not fully understood. The only spontaneous animal model for autoimmune uveitis in man is equine recurrent uveitis (ERU), a remitting-relapsing disease of horses that results in blindness [2,3]. There are many similarities in clinical presentation, the course of the disease and autoimmune reactions between human autoimmune uveitis patients and ERU cases [2,4]. These resemblances and the fact that intraocular tissue samples are available from horses in all stages of disease, which have an outbred genetic background and are exposed to all typical environmental conditions, render ERU an ideal model for uveitis in man. Thus, investigating pathomechanisms contributing to this frequently occurring eye disease of horses has become very important [2,5].

Retinal pigment epithelium (RPE) builds the outer blood-retinal barrier [6] and is the crucial part of the immune defense of the eye [7]. We started with in-depth molecular analysis of RPE cells by creating an equine cell line and comparing the cell surface proteome of Passage 4 equine RPE cells and native cells [6]. Since there was a significant alteration between cell surface proteomes of native and cultured cells, the suitability of cultured cells for molecular analyses was affected [6]. Thus, in a follow-up study, we used *in situ* labelling of tissue samples in very short post-mortem times, which enabled the identification of 148 RPE cell surface proteins, potentially representing their appearance in physiological and pathophysiological *in vivo* processes [5].

Among these 148 proteins, 27 were differentially expressed between healthy and ERU cases [5]. Surprisingly, one of the differentially expressed proteins, detected in equine RPE, was peripherin 2, which is, under normal physiological conditions, responsible for visual perception and retina development [5]. Peripherin 2 is known to be selectively expressed in the photoreceptor outer segment of the retina [8], and mutations in the *peripherin 2* gene are commonly associated with retinal degenerative diseases, like retinitis pigmentosa and autosomal dominant macular dystrophy in man [9]. However, until now, there was no information about peripherin 2 expression in RPE and whether expression changes of peripherin 2 were associated with autoimmune uveitis.

Therefore, the goal of this study was to validate our novel finding of peripherin 2 localization to equine, as well as to human RPE cells and to characterize the respective expression patterns of peripherin 2 in physiological and uveitic equine eyes.

2. Results

2.1. *Peripherin 2* Locates to the Photoreceptor Outer Segments of Equine Retina with no Significant Difference between Healthy and ERU Diseased Samples

Mutations in the *peripherin 2* gene are associated with many human retinal degenerative diseases, like retinitis pigmentosa and adult vitelliform macular dystrophy [8]. Therefore, and due to the fact that, to our knowledge, there was no information about the expression pattern of peripherin 2 in equine retina, we were interested in assessing its physiological expression pattern, as well as its disease-associated changes. We thus performed antibody-based staining of healthy and uveitic retinal sections (Figure 1). Differential interference contrast (DIC) images show representative retinas of healthy (Figure 1A–D) and diseased (Figure 1E–H) horses. In healthy equine retina, peripherin 2 was detectable in photoreceptor outer segments with equal intensity along the whole intact photoreceptor layer (Figure 1B, peripherin 2 = red). Interestingly, the same expression pattern was found in ERU diseased retinas (early stages), where peripherin 2 was also localized in the thinner, but still completely intact, photoreceptor outer segments with a similar intensity and distribution (Figure 1F, peripherin 2 = red) as in healthy equine retinas (Figure 1B, peripherin 2 = red). Since rhodopsin is a typical photoreceptor marker [10], we were interested in its expression pattern in healthy and uveitic equine retinas compared to the expression pattern of peripherin 2. Therefore, sections stained with anti-peripherin 2 were also stained with anti-rhodopsin. Like peripherin 2, rhodopsin was detectable in photoreceptor outer segments with an equal distribution and intensity in healthy retina sections (Figure 1C, rhodopsin = green). The same expression pattern of rhodopsin was found in ERU diseased retinas (Figure 1G, rhodopsin = green). In addition, the overlay of peripherin 2 and rhodopsin showed the same expression pattern in healthy (Figure 1D, peripherin 2 = red, rhodopsin = green, overlap of peripherin 2 and rhodopsin = yellow), as well as in uveitic retinas (Figure 1H, peripherin 2 = red, rhodopsin = green, overlap of peripherin 2 and rhodopsin = yellow).

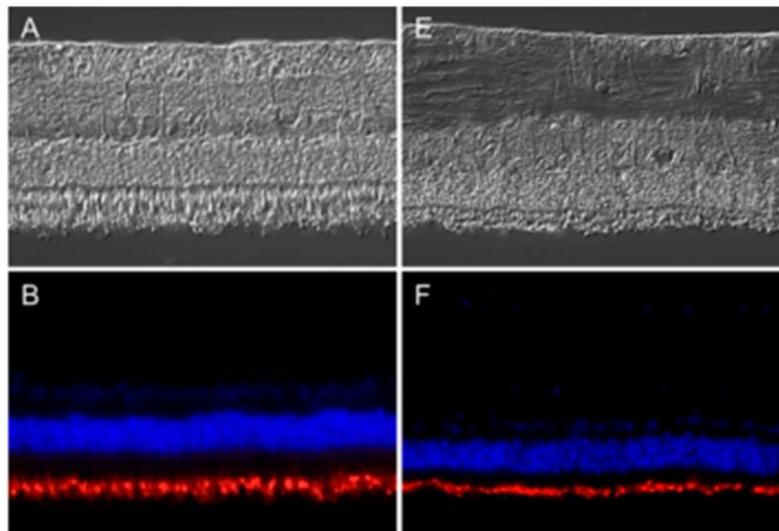


Figure 1. Cont.

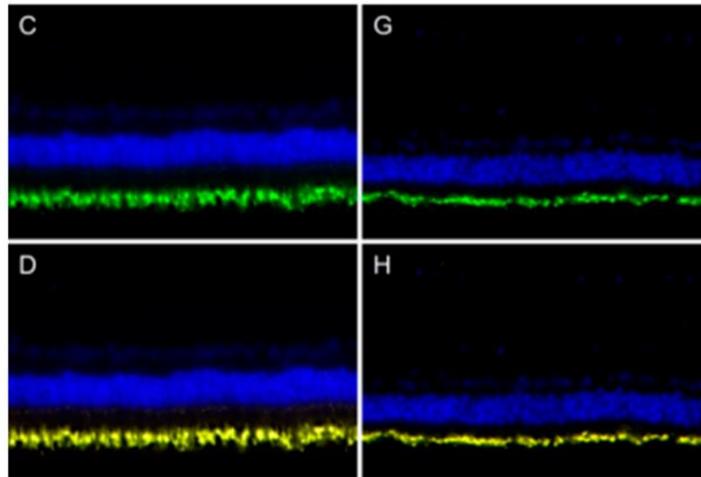


Figure 1. Expression pattern of peripherin 2 (red) and rhodopsin (green) in representative retinas of healthy (**left**) and equine recurrent uveitis (ERU) cases (**right**). Differential interference contrast image of healthy (**A**) and diseased (**E**) equine retina. Peripherin 2 (red) was equally distributed in the photoreceptor outer segments of healthy (**B**) and diseased (**F**) equine retina. Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (blue); Rhodopsin (green) was also equally distributed in photoreceptor outer segments of healthy (**C**) and uveitic (**G**) retinas. The overlap of peripherin 2 and rhodopsin in healthy (**D**) and uveitic (**H**) retina show overlapping expression pattern of both proteins (yellow).

2.2. Peripherin 2 Is Detectable in Healthy Equine RPE Cells and Downregulated in Uveitic Cases

Peripherin 2 was known to be localized in photoreceptor outer segments of mouse, rat and bovine retina [11,12]. In this study, we found a similar expression pattern in photoreceptor outer segments in horse retina (Figure 1). Interestingly, in a prior study, we detected peripherin 2 on the cell surface of RPE cells using *in situ* biotinylation followed by LC-MS/MS [5]. Since the peripherin 2 expression pattern in RPE was not described yet, we performed immunohistochemistry to localize peripherin 2 in healthy equine RPE and to examine ERU-associated changes in diseased equine RPE (Figure 2). In order to exclude the correlation of decreased peripherin 2 expression with the destruction of diseased RPE cells in advanced stages of ERU, we only investigated morphologically intact RPE of ERU cases. Thus, DIC images of healthy (Figure 2A) and diseased (Figure 2E) equine RPE showed a morphologically intact RPE monolayer in both cases. In healthy equine RPE, peripherin 2 was expressed across the whole cell and along the whole RPE layer, excluding the apical rim (Figure 2B, peripherin 2 = red). In addition, the intensity of peripherin 2 was constant throughout the entire healthy RPE with some enhanced spots (Figure 2B, peripherin 2 = red). Interestingly, immunohistochemical staining of RPE of diseased horses revealed a significant reduction of peripherin 2 expression in uveitic RPE (Figure 2F, peripherin 2 = red, the same specimen as shown in Figure 1E–H). Accordingly, expression changes of peripherin 2 selectively concerned RPE cells, but not photoreceptor outer segments in ERU cases (Figures 1E–H and 2E,F, the same ERU case). Peripherin 2 expression was limited to a few small spots in diseased RPE, and the intensity of

peripherin 2 was significantly reduced (Figure 2F, peripherin 2 = red) compared to healthy controls (Figure 2B, peripherin 2 = red). Since RPE cells are the most active phagocytic cells in the body [10], it seemed obvious that peripherin 2 gets into RPE by phagocytosis. In order to pursue this thought, we double stained RPE sections for peripherin 2 and rhodopsin (Figure 2). We decided to use rhodopsin, because it is known to be phagocytized within photoreceptor outer fragments by RPE, making rhodopsin a suitable marker for phagocytic processes [13,14]. Both in healthy (Figure 2C, rhodopsin = green) and in uveitic (Figure 2G, rhodopsin = green) RPE, rhodopsin was typically concentrated in a few spots, which were distributed over the whole RPE layer. In contrast to peripherin 2 (Figure 2B,F, peripherin = red), the rhodopsin localization pattern was unchanged in uveitic RPE compared to healthy controls. Regarding the overlap of the two proteins, it becomes apparent that the spots expressing rhodopsin were also clearly positive for peripherin 2 (Figure 2D,H, overlap of peripherin 2 and rhodopsin = yellow). Besides, peripherin 2 was constantly expressed throughout the entire remaining parts of healthy RPE (Figure 2D, peripherin 1 = red, rhodopsin = green, overlap of peripherin 2 and rhodopsin = yellow). In contrast, in uveitic RPE, downregulation of peripherin 2 was clearly detectable, and only spots stained positive for rhodopsin were also positive for peripherin 2 (Figure 2H, overlap of peripherin 2 and rhodopsin = yellow).

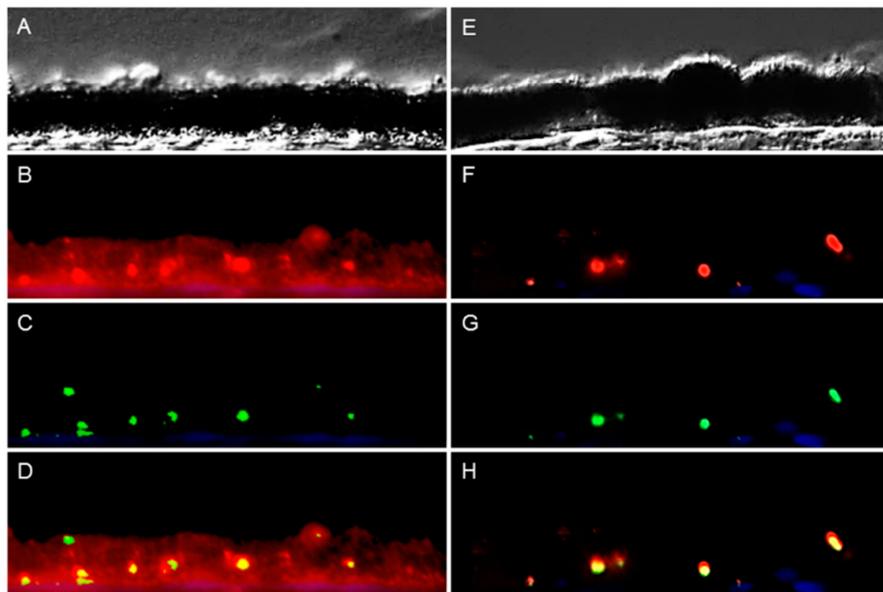


Figure 2. Peripherin 2 (red) and rhodopsin (green) expression in retinal pigment epithelium (RPE) of representative healthy (**left**) and ERU cases (**right**). Differential interference contrast image of healthy (**A**) and diseased (**E**) equine RPE. In healthy (**B**) RPE, peripherin 2 was expressed over the entire RPE cell layer, and the intensity was enhanced in some spots. In uveitic RPE cells (**F**), peripherin 2 was significantly reduced to few small spots; Rhodopsin was limited to few isolated spots, distributed throughout the whole RPE layer, in healthy (**C**), as well as in diseased (**G**) RPE. The overlap of peripherin 2 and rhodopsin in healthy (**D**) RPE indicates significant higher expression of peripherin 2 compared to rhodopsin (the yellow overlap is only displayed in a few spots). In uveitic RPE (**H**), peripherin 2 was only expressed at rhodopsin expression sites (yellow spots).

2.3. Expression Changes of Peripherin 2 Selectively Concerned RPE Cells, but not Photoreceptor Outer Segments in ERU Cases

To quantify the expression of peripherin 2 and rhodopsin, fluorescence intensities of healthy and uveitic retinas and RPE were measured and analyzed (Figure 3). A comparison of the fluorescence intensity of peripherin 2 in healthy retinas (Figure 3A, grey column, $100\% \pm 22.8\%$) and uveitic retinas (Figure 3A, black column, $110.4\% \pm 32.9\%$) revealed no significant difference of protein expression in photoreceptors. A similar result was shown for the quantification of the fluorescence intensity of rhodopsin in healthy (Figure 3B, grey column, $100\% \pm 8.6\%$) and uveitic (Figure 3B, black column, $104.1\% \pm 5.8\%$) photoreceptor outer segments. In addition, rhodopsin expression in healthy RPE (Figure 3D, grey column, $100\% \pm 7.8\%$) did not significantly differ from uveitic RPE (Figure 3D, black column, $103.9\% \pm 5.1\%$). In contrast, the mean fluorescence intensity of peripherin 2 in equine RPE cells of ERU cases (Figure 3C, black column) was significantly reduced to $17.9\% \pm 5\%$ (** $p \leq 0.01$) of the physiological expression in healthy controls (Figure 3C, grey column, $100\% \pm 28.1\%$).

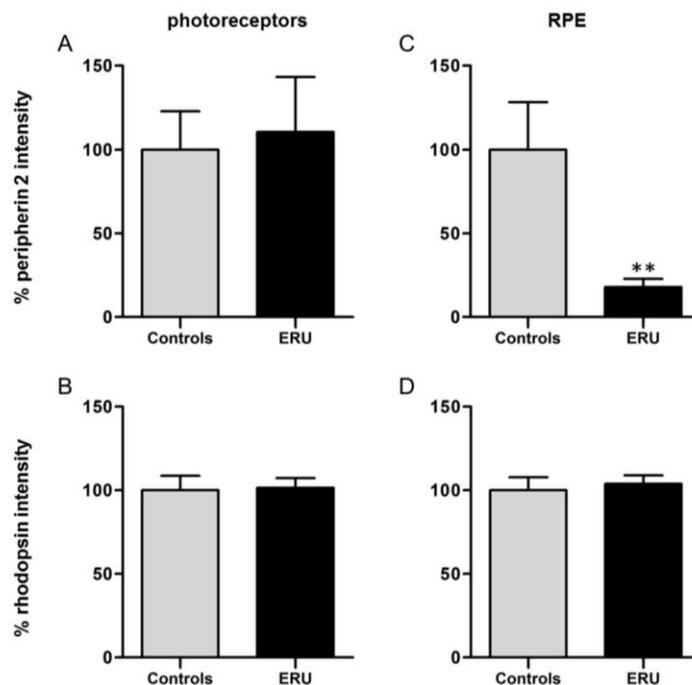


Figure 3. (A) Quantification of the fluorescence intensity of peripherin 2 expression in photoreceptor outer segments revealed no significant difference between healthy (grey column) and ERU cases (black column); (B) There was also no significant difference between the fluorescence intensity of rhodopsin in photoreceptor outer segments of healthy (grey column) and uveitic (black column) retinas detectable; (C) A significant reduction of the fluorescence intensity of peripherin 2 in uveitic RPE to 17.9% (black column), compared to RPE of negative controls (** $p \leq 0.01$); (D) Quantification of the fluorescence intensity of rhodopsin in RPE showed no significant difference between healthy (grey column) and ERU cases (black column).

2.4. Cultivated RPE Cells still Express Peripherin 2

To investigate whether RPE cells express peripherin 2 by themselves or if the protein got into RPE cells just by phagocytosis, we investigated the peripherin 2 expression pattern of cultivated, primary healthy RPE cells (Figure 4). Differential interference contrast image shows healthy RPE cells (Figure 4A–C) at different confluency states, from single cells (Figure 4A) up to confluent cells (Figure 4C). In each growth stage, peripherin 2 expression was clearly detectable over the whole RPE cell with an equal intensity (Figure 4D–F, peripherin 2 = red). Furthermore, we stained these healthy RPE cells also for rhodopsin to examine the appearance of rhodopsin compared to peripherin 2 in cultivated RPE cells. In contrast to peripherin 2, rhodopsin was not detectable in passaged RPE cells (Figure 4G–I).

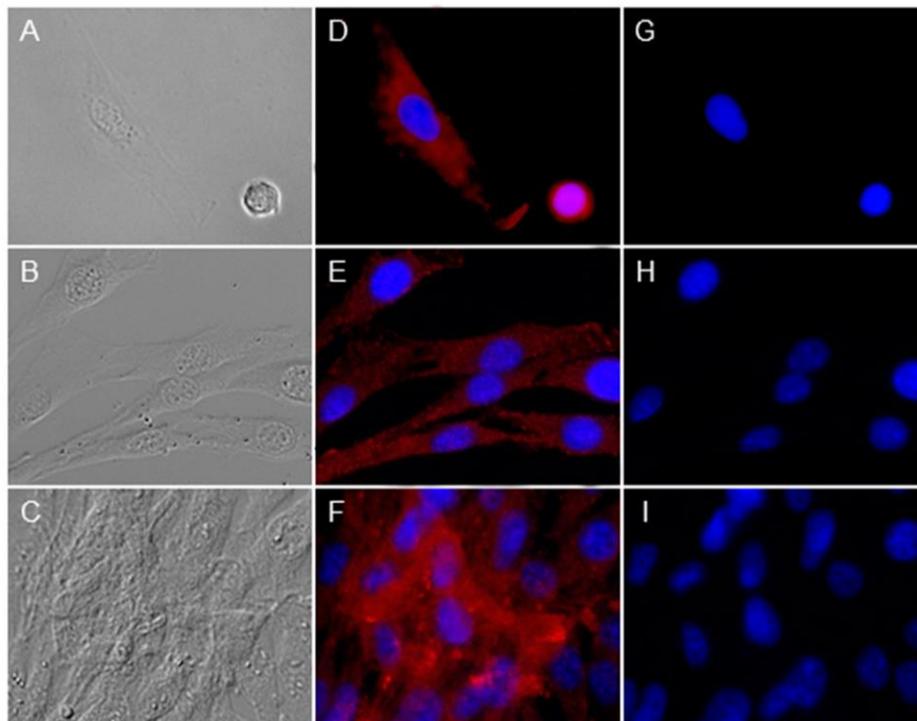


Figure 4. Investigation of peripherin 2 (red) and rhodopsin (green) expression on cultivated healthy RPE cells at different confluency states. Differential interference contrast image of healthy equine RPE cells at different confluency states; from single cells (A) to 40% confluent cells (B) up to 90%–100% confluent cells (C); (D–F) Peripherin 2 (red) was expressed over whole RPE cells with an even intensity (cell nuclei = blue); (G–I) No rhodopsin (green) expression was found in primary healthy equine RPE cells (cell nuclei = blue).

2.5. Peripherin 2 Is also Expressed by Human RPE

To strengthen our novel finding of peripherin 2 existence in RPE, we wanted to investigate whether the expression of peripherin 2 was also detectable in human RPE cells. Therefore, we detected

peripherin 2 expression with immunohistochemistry in human RPE sections. Peripherin 2 staining of human RPE sections corresponded very well with our latest findings of the peripherin 2 distribution in equine RPE. As in healthy equine RPE, peripherin 2 was clearly detectable over the whole RPE layer with an equal intensity in human RPE (Figure 5, peripherin 2 = red).

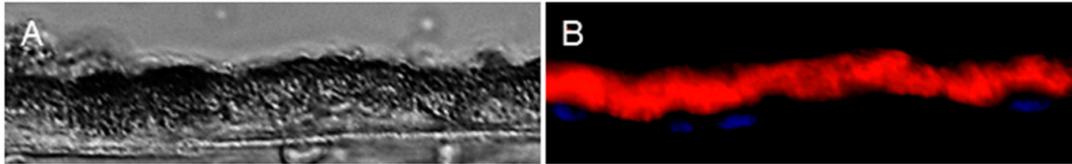


Figure 5. Peripherin 2 (red) expression in healthy human RPE. (A) Differential interference contrast image of healthy human RPE; (B) peripherin 2 (red) was expressed over the whole RPE layer with an even intensity.

3. Discussion

Pathogenesis and etiology of ERU, the only spontaneous animal model for human autoimmune uveitis, are not entirely clarified to date [3,15]. However, differential proteome analyses provided more insights into the molecular pathomechanisms of this spontaneously occurring disease by detecting several differentially-expressed proteins in uveitic vitreous, retina, sera and infiltrating leukocytes, which might be crucially involved in disease development and progression [2,16–20]. Since one characteristic feature of ERU is the breakdown of the outer blood-retinal barrier [21], the RPE is significantly involved in the pathophysiological processes of uveitis. Thus, we recently performed comparative analysis of the plasma cell membrane proteomes of healthy and uveitic RPE cells *in situ* to gain a better understanding of the pathomechanisms leading to the breakdown of the blood-retinal barrier [5]. Interestingly, one of the differentially-expressed plasma cell membrane proteins was peripherin 2, which is, under normal physiological conditions, responsible for visual perception and retina development (according to GO terminology). Peripherin 2 was found to be substantially downregulated in ERU cases [5]. In the present study, we were now able to validate this novel localization of peripherin 2 in physiological equine RPE (Figure 2) and its significant downregulation in ERU (Figures 2 and 3). Moreover, we were able to detect peripherin 2 in human RPE (Figure 5). Then, we further characterized the expression pattern of peripherin 2 in equine RPE, and thereby, we could show the localization of peripherin 2 in the whole healthy RPE cell, whereas in our previous study, we only knew about the occurrence in the plasma cell membrane [5]. Furthermore, we demonstrated that peripherin 2 is localized with an even intensity in the photoreceptor outer segments of rods and cones in physiological equine retina (Figure 1). So far, a similar expression pattern of peripherin 2 within photoreceptor outer segments was detected in other species, like cows, rats and mice [12,22].

Even more interesting, in our point of view, is the novel finding of peripherin 2 expression in equine (Figure 2) and human (Figure 5) RPE cells. To our knowledge, the localization of peripherin 2 in RPE was not described in other species so far. One question was how peripherin 2 gets in this position. Since one of the main functions of RPE cells is phagocytosis of photoreceptor outer fragments (10% per day) [13], it seemed obvious that peripherin 2 is phagocytized and, hence, to be

found in the phagosomes of RPE cells. As rhodopsin is a major protein in photoreceptor outer segments, it is already known to be phagocytized by RPE cells and, therefore, used as a marker for phagocytosis activity [14]. Thus, we investigated possible co-localization of rhodopsin and peripherin 2 in equine RPE, which would indicate an association of peripherin 2 with RPE phagocytosis. Double-stainings of rhodopsin and peripherin 2 in healthy RPE revealed peripherin 2 distribution over the whole RPE layer, whereas rhodopsin was concentrated to a few spots (Figure 2). This localization pattern of peripherin 2 and rhodopsin led to the following assumption: spots staining positive for rhodopsin are presumably phagosomes, containing photoreceptor outer segment waste, including rhodopsin. As peripherin 2 was also localized in these spots, it can be concluded that peripherin 2, like rhodopsin, is phagocytized by RPE cells. Recently, the co-localization and interaction of peripherin 2 and rhodopsin in photoreceptor outer segments were detected for the first time by *in vitro* (HEK293 cells) and *in vivo* (mouse retina) co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer [23]. It was shown that peripherin 2 was required as a molecular linker between rhodopsin and the rod cyclic nucleotide-gated channel [23]. Thereby, peripherin 2 binds to rhodopsin with high affinity, comparable to that of rhodopsin dimers [23]. These findings further strengthen our thesis that peripherin 2 is phagocytized in the same manner as rhodopsin by RPE cells.

However, we found peripherin 2 not only in co-localization with rhodopsin, but also equally distributed over the whole healthy RPE (Figure 2). Therefore, it seems obvious that peripherin 2 is additionally expressed by RPE cells. To prove this presumption, we stained healthy cultivated RPE cells with anti-peripherin 2 and anti-rhodopsin antibodies. In contrast to rhodopsin, which was not found in cultivated RPE cells, peripherin 2 was detectable over the whole cell (Figure 4). In conclusion, peripherin 2 gets into RPE cells by phagocytosis, but is additionally expressed by healthy RPE cells themselves.

In uveitic RPE sections, no difference between rhodopsin and peripherin 2 localization was detectable, and overlapping of both stainings was found in a few spots, mainly localized in the basal side of RPE layer (Figure 2). Thus, localization of phagosomes in healthy compared to uveitic RPE leads to another interesting finding: there was no detectable alteration in the RPE engulfment capability of ERU diseased horses in the stages of disease, in which RPE cells are morphologically still intact. However, whether the degradation of photoreceptor outer segments is affected in the case of uveitis or not has to be clarified in further studies by *in vitro* phagocytosis assays, for example. A model for an eye disease in which altered phagocytosis activity of diseased RPE cells was associated with pathomechanisms leading to progressive and irreversible central vision loss is Best's disease, an inherited degenerative disease of human macula, which is caused by mutations in the RPE gene, bestrophin 1 [24]. By performing phagocytosis assays with rhodopsin, a delayed degradation of photoreceptor outer segments occurred in RPE cells of Best disease compared to controls, which led to reduced clearance of photoreceptor outer segments [24].

Also of high interest are the known functional features of peripherin 2 in photoreceptors, like the responsibility for tissue morphogenesis and stability, as well as membrane fusion processes [23], since they are also very important functions of RPE. Therefore, downregulated peripherin 2 in uveitic RPE (Figures 2 and 3) could lead to functional restrictions of RPE in ERU cases. To what extent peripherin 2 is associated with the breakdown of the blood-retinal barrier in uveitic cases is still being investigated. Interestingly, even though peripherin 2 was never described with changed expression in uveitis before,

it is very often involved in retinal pathologies, such as adult-onset foveomacular vitelliform dystrophy, pattern dystrophies, cone-rod dystrophies, retinitis pigmentosa and retinitis punctata albescens through mutations of the *peripherin 2* gene [11,25]. The normal product of the *peripherin 2* gene, the protein peripherin 2, was for the first time identified in 1992 by cDNA sequence analysis [26]. Up to now, more than 150 mutations in the *peripherin 2* gene, leading to these retinal diseases, have been identified (available online: <http://www.retina-international.org/files/sci-news/rdsmut.html>). Depending on the particular mutation, varying retinal degenerations develop. Most closely to our findings that peripherin 2 expression is downregulated in uveitis (Figures 2 and 3), the nmf193 mutant mouse model, exhibiting a single base change in the *peripherin 2* gene, showed the downregulation of peripherin 2 in photoreceptor outer segments [27]. In this model, downregulation of peripherin 2 expression may directly contribute to the pathology of photoreceptor degeneration [27]. These nmf193 mutant mice show photoreceptor outer segment defects and progressive retinal degeneration [27]. Since the same reduction of peripherin 2 and similar photoreceptor degeneration of the nmf193 mutant was also found in another, non-peripherin 2 gene-associated mouse mutant of the photoreceptor-specific nuclear receptor gene, Nr2e3, a direct connection between decreased peripherin 2 expression and photoreceptor degeneration was concluded [27]. This direct association between decreased [27] or absent peripherin 2 expression [28] and the degeneration of photoreceptor cells suggests that also the reduction of peripherin 2 in diseased RPE cells could lead to the damage of RPE cells followed by disruptions of cell-cell junctions with consequently increased permeability of the outer blood-retinal barrier. To what extent peripherin 2 reduction in uveitic RPE is essentially associated with the mechanisms leading to blood-retinal barrier breakdown in the case of ERU is yet to be clarified. Therefore, one next step could be to perform leukocyte transmigration assays through a RPE monolayer knocked down for peripherin 2 using siRNA.

4. Experimental Section

4.1. Retina and RPE Specimen

For this study, the eyes of 19 horses (11 healthy controls and 8 spontaneous ERU cases) and of one human donor without a known history of eye disease were used. In detail, the eyes of 15 horses (7 healthy controls and 8 spontaneous ERU cases) and of one human donor were used for immunohistochemical stainings of retina and RPE sections, and 4 healthy equine eyes were used for immunocytochemical stainings. The specimens of healthy equine eyes and ERU cases were obtained from horses that had to be euthanized due to causes unrelated to this study. The collection and use of equine eyes from animals that were killed due to a research-unrelated cause were approved for the purposes of scientific research by the appropriate board of the veterinary inspection office, Munich, Germany (Permit Number 8.175.10024.1319.3). Horses were treated according to the ethical principles and guidelines for scientific experiments on animals according to the Assosiation for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. No experimental animals were used in this study. Sampling of the human donor eyes was approved by the local ethics committee in compliance with the tenets of the declaration of Helsinki. The donor gave informed consent.

4.2. Preparation for Immunohistochemistry

Posterior eyecups of horses were immersion-fixed with Bouin's solution (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany). The human eye was obtained already fixed in formalin. The fixation was followed by dehydration in ascending alcohol series and slicing into pre-assigned fragments, as described before [29]. Afterwards, tissue blocks were embedded in paraffin, sectioned with a thickness of 8 µm and collected on coated slides (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany).

4.3. Immunohistochemistry of Target Tissue

Deparaffination of tissue sections was performed with xylol. Then, sections were rehydrated in descending alcohol series. Heat antigen retrieval was performed in citrate buffer at 99 °C for 15 min. To prevent unspecific antibody binding, sections were blocked with 1% bovine serum albumin in Tris-buffered saline-tween (TBS-T; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2, 0.1% Tween 20) containing 5% normal goat serum for 40 min at room temperature. The next step was to incubate retina and RPE sections with primary antibody against peripherin 2 (mouse monoclonal antibody 5H2, directed against the 35-amino acid C-terminal segment of bovine peripherin 2, kindly provided by Robert S. Molday, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; dilution 1:50) [26] and equine retina and RPE sections additionally with primary antibody against rhodopsin (rat monoclonal antibody supernatant 5G6, already characterized as cross-reactive with horse rhodopsin [30]) at 4 °C overnight, followed by a washing step with TBS-T. Then, sections were incubated with anti-mouse IgG Alexa Fluor 647 and anti-rat IgG Alexa Fluor 546 (both Invitrogen, Karlsruhe, Germany; dilution: 1:500), respectively, for 30 min at room temperature. Cell nuclei were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen; dilution: 1:1000). Finally, sections were mounted with glass cover slips using Roti Mount Fluor Care (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Fluorescent images were recorded using Axio Imager M1 and Axio Vision 4.8 software (both Zeiss, Göttingen, Germany).

4.4. Separation of Equine RPE Cells for Immunocytochemistry

Eyes were prepared immediately after collection as described before [5]. Briefly, the first step was to remove the residual periocular tissue. Eye globes were cut open circumferentially, and anterior parts of the eye, vitreous and neurosensory retina were carefully removed. The RPE cell layer was then enzymatically detached from the underlying Bruch's membrane and choroid by filling the eyecups with pre-warmed dissociation buffer (40 U/mL papain, Carl Roth; 1 mM PBS/EDTA pH 7.4; 260 mM L-cysteine, Sigma Aldrich; 1% bovine serum albumin) and incubated at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere for 25 min. Afterwards, RPE cells were resuspended in dissociation buffer inside the eyecup and transferred into DMEM (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) (both PAN-Biotech) to block the enzymatic activity of papain. The next step was to centrifuge the suspension at 130× g for 5 min and wash the RPE cells two times. Finally, RPE cells were resuspended in DMEM containing 10% FCS and 1% P/S, seeded into T25 cell culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and cultivated at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere until the cells were 90%–100% confluent. Subsequently, for cell passaging,

medium was removed and cells were washed with PBS. To detach cells from the bottom of the flask, cells were incubated with Trypsin (0.05%)/EDTA (0.02%) (PAN-Biotech) at 37 °C for 5 min. Cells were then resuspended and collected in PBS and centrifuged at 130× g for 5 min to stop the reaction. Then, an appropriate number of cells was resuspended in medium, divided and transferred into a T75 cell culture flask.

4.5. Preparation for Immunocytochemistry

Equine RPE cells were harvested with Trypsin (0.05%)/EDTA (0.02%) for 5 min, washed twice with PBS and centrifuged between washing steps at 4 °C, 130× g for 5 min. Then, they were seeded onto glass slides and allowed to attach and grow at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere for 48 h. Slides were rinsed in PBS, and after drying, they were fixed in ice cold acetone for 10 min. To prevent unspecific antibody binding, slides were blocked with 1% BSA in TBS-T and 5% normal goat serum for 40 min at room temperature. Fluorescence labelling and image acquisition was performed similarly as for immunohistochemistry of retina and RPE sections.

4.6. Quantification of Fluorescence Intensities

The fluorescence intensities of photoreceptor segments of 6 healthy and 6 diseased retina sections and the fluorescence intensities of RPE cells of 7 healthy and 8 diseased RPE sections were quantified using open source ImageJ 1.47 software (available online: <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). First, the area and the integrated density of the region of interest (Region 1) were measured. For background subtraction, the mean grey value of a region without fluorescence (Region 2) was measured. The following formula was used to calculate the corrected total fluorescence (CTF):

$$\text{CTF} = \text{integrated density of Region 1} - (\text{area of Region 1} \times \text{mean grey value of Region 2}) \quad (1)$$

The mean value from healthy CTFs was formed and set to 100%. Statistical analyses were performed using the Kolmogorov–Smirnov test first to determine the data distribution. Since the fluorescence intensities of peripherin 2 of diseased RPE samples and controls were not normally distributed (Kolmogorov–Smirnov: $p \leq 0.05$), the Mann–Whitney test was applied for the calculation of abundances. The data of the statistical analysis were considered as significant with a p -value of ≤ 0.05 (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

5. Conclusions

Investigations of the changes at the outer blood-retinal barrier in the case of uveitis at the molecular level enabled us to gain novel important insights into the sight-threatening disease, ERU. We demonstrated, for the first time, that peripherin 2 is obviously detectable in healthy human, as well as in healthy equine RPE. Peripherin 2 gets into RPE cells by phagocytosis similarly to rhodopsin, but is additionally expressed by healthy RPE cells themselves. Furthermore, expression changes of peripherin 2 selectively concern RPE cells, but not photoreceptor outer segments in uveitic cases, pointing to a disease-associated role of selective peripherin 2 downregulation in the outer blood retinal barrier. Novel localization and characterization of peripherin 2 in healthy and uveitic RPE cells

is very interesting and sets the foundation for further examinations of the physiological and pathophysiological processes taking place in the RPE.

Acknowledgments

This project was financially supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft, DE 719/4-1 to Cornelia A. Deeg. Further, the authors would like to thank Robert S. Molday for kindly providing the anti-peripherin monoclonal antibody, 5H2, and Christoph Szober for critical discussions.

Author Contributions

Cornelia A. Deeg and Stefanie M. Hauck conceived of and designed the experiments. Cornelia A. Deeg, Stefanie M. Hauck, Patrizia B. Uhl and Barbara Amann performed the experiments and analyzed data. Cornelia A. Deeg, Stefanie M. Hauck and Patrizia B. Uhl wrote the paper.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bharadwaj, A.S.; Schewitz-Bowers, L.P.; Wei, L.; Lee, R.W.; Smith, J.R. Intercellular adhesion molecule 1 mediates migration of th1 and th17 cells across human retinal vascular endothelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 6917–6925.
2. Degroote, R.L.; Hauck, S.M.; Amann, B.; Hirmer, S.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Unraveling the equine lymphocyte proteome: Differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis. *PLoS One* **2014**, *9*, e91684.
3. Hofmaier, F.; Hauck, S.M.; Amann, B.; Degroote, R.L.; Deeg, C.A. Changes in matrix metalloproteinase network in a spontaneous autoimmune uveitis model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 2314–2320.
4. Deeg, C.A.; Pompetzki, D.; Raith, A.J.; Hauck, S.M.; Amann, B.; Suppmann, S.; Goebel, T.W.; Olazabal, U.; Gerhards, H.; Reese, S.; *et al.* Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1462–1470.
5. Uhl, P.B.; Szober, C.M.; Amann, B.; Alge-Priglinger, C.; Ueffing, M.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. *In situ* cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis. *J. Proteomics* **2014**, *109*, 50–62.
6. Szober, C.M.; Hauck, S.M.; Euler, K.N.; Frohlich, K.J.; Alge-Priglinger, C.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Profound re-organization of cell surface proteome in equine retinal pigment epithelial cells in response to *in vitro* culturing. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 14053–14072.
7. Deeg, C.A.; Thurau, S.R.; Gerhards, H.; Ehrenhofer, M.; Wildner, G.; Kaspers, B. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 2598–2606.

8. Conley, S.M.; Stuck, M.W.; Burnett, J.L.; Chakraborty, D.; Azadi, S.; Fliesler, S.J.; Naash, M.I. Insights into the mechanisms of macular degeneration associated with the r172w mutation in RDS. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 3102–3114.
9. Duncan, J.L.; Talcott, K.E.; Ratnam, K.; Sundquist, S.M.; Lucero, A.S.; Day, S.; Zhang, Y.; Roorda, A. Cone structure in retinal degeneration associated with mutations in the *peripherin/RDS* gene. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 1557–1566.
10. Mao, Y.; Finnemann, S.C. Analysis of photoreceptor outer segment phagocytosis by rpe cells in culture. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *935*, 285–295.
11. Stuck, M.W.; Conley, S.M.; Naash, M.I. The Y141C knockin mutation in rds leads to complex phenotypes in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 6260–6274.
12. Arikawa, K.; Molday, L.L.; Molday, R.S.; Williams, D.S. Localization of peripherin/RDS in the disk membranes of cone and rod photoreceptors: Relationship to disk membrane morphogenesis and retinal degeneration. *J. Cell. Biol.* **1992**, *116*, 659–667.
13. Wavre-Shapton, S.T.; Meschede, I.P.; Seabra, M.C.; Futter, C.E. Phagosome maturation during endosome interaction revealed by partial rhodopsin processing in retinal pigment epithelium. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 3852–3861.
14. Zigler, J.S., Jr.; Zhang, C.; Grebe, R.; Sehrawat, G.; Hackler, L., Jr.; Adhya, S.; Hose, S.; McLeod, D.S.; Bhutto, I.; Barbour, W.; *et al.* Mutation in the β A3/A1-crystallin gene impairs phagosome degradation in the retinal pigmented epithelium of the rat. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 523–531.
15. Degroote, R.L.; Hauck, S.M.; Treutlein, G.; Amann, B.; Frohlich, K.J.; Kremmer, E.; Merl, J.; Stangassinger, M.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 5812–5819.
16. Hauck, S.M.; Hofmaier, F.; Dietter, J.; Swadzba, M.E.; Blindert, M.; Amann, B.; Behler, J.; Kremmer, E.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 4545–4554.
17. Hauck, S.M.; Dietter, J.; Kramer, R.L.; Hofmaier, F.; Zipplies, J.K.; Amann, B.; Feuchtinger, A.; Deeg, C.A.; Ueffing, M. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 2292–2305.
18. Hauck, S.M.; Schoeffmann, S.; Amann, B.; Stangassinger, M.; Gerhards, H.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Retinal mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2121–2131.
19. Deeg, C.A.; Altmann, F.; Hauck, S.M.; Schoeffmann, S.; Amann, B.; Stangassinger, M.; Ueffing, M. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* **2007**, *7*, 1540–1548.
20. Zipplies, J.K.; Hauck, S.M.; Schoeffmann, S.; Amann, B.; van der Meijden, C.H.; Stangassinger, M.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Kininogen in autoimmune uveitis: Decrease in peripheral blood stream *versus* increase in target tissue. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 375–382.

21. Swadzba, M.E.; Hirmer, S.; Amann, B.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. Vitreal IgM autoantibodies target neurofilament medium in a spontaneous model of autoimmune uveitis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 294–300.
22. Boesze-Battaglia, K.; Song, H.; Sokolov, M.; Lillo, C.; Pankoski-Walker, L.; Gretzula, C.; Gallagher, B.; Rachel, R.A.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G.; *et al.* The tetraspanin protein peripherin-2 forms a complex with melanoregulin, a putative membrane fusion regulator. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1256–1272.
23. Becirovic, E.; Nguyen, O.N.; Papanizos, C.; Butz, E.S.; Stern-Schneider, G.; Wolfrum, U.; Hauck, S.M.; Ueffing, M.; Wahl-Schott, C.; Michalakakis, S.; *et al.* Peripherin-2 couples rhodopsin to the cng channel in outer segments of rod photoreceptors. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 5989–5997.
24. Singh, R.; Shen, W.; Kuai, D.; Martin, J.M.; Guo, X.; Smith, M.A.; Perez, E.T.; Phillips, M.J.; Simonett, J.M.; Wallace, K.A.; *et al.* IPS cell modeling of best disease: Insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 593–607.
25. Leroy, B.P.; Kailasanathan, A.; de Laey, J.J.; Black, G.C.; Manson, F.D. Intrafamilial phenotypic variability in families with *RDS* mutations: Exclusion of *rom1* as a genetic modifier for those with retinitis pigmentosa. *Br. J. Ophthalmol.* **2007**, *91*, 89–93.
26. Connell, G.; Bascom, R.; Molday, L.; Reid, D.; McInnes, R.R.; Molday, R.S. Photoreceptor peripherin is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the RDS mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 723–726.
27. Nystuen, A.M.; Sachs, A.J.; Yuan, Y.; Heuermann, L.; Haider, N.B. A novel mutation in *Prph2*, a gene regulated by *Nr2e3*, causes retinal degeneration and outer-segment defects similar to *Nr2e3^{rd7/rd7}* retinas. *Mamm. Genome* **2008**, *19*, 623–633.
28. Sanyal, S.; Jansen, H.G. Absence of receptor outer segments in the retina of *rds* mutant mice. *Neurosci. Lett.* **1981**, *21*, 23–26.
29. Ehrenhofer, M.C.; Deeg, C.A.; Reese, S.; Liebich, H.G.; Stangassinger, M.; Kaspers, B. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet. Ophthalmol.* **2002**, *5*, 39–47.
30. Deeg, C.A.; Hauck, S.M.; Amann, B.; Kremmer, E.; Stangassinger, M.; Ueffing, M. Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 3291–3296.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5 DISKUSSION

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine spontane und sehr häufige Augenentzündung beim Pferd und stellt das einzige spontane Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis dar (Degroote et al. 2014). Charakteristisch für die ERU ist der Verlauf der Krankheit, dieser ist gekennzeichnet durch immer wiederkehrende Entzündungsschübe, welche von entzündungsfreien Phasen unterschiedlicher Dauer unterbrochen werden (Edelmann et al. 2014, Spiess 1997). Die in immer kürzeren Abständen auftretenden Entzündungsschübe gehen mit einer progressiven Zerstörung der intraokulären Strukturen einher, was letztendlich zur Erblindung des betroffenen Auges führt (Deeg et al. 2002a, Degroote et al. 2014). Bisher konnten die Ätiologie und die Pathogenese der ERU nicht ausreichend geklärt werden. Fest steht, dass es sich um ein autoimmunmediertes Geschehen handelt, welches durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke (BRS) und den Übertritt von autoreaktiven T-Lymphozyten in das innere Auge gekennzeichnet ist (Deeg et al. 2002b, Degroote et al. 2014). Die BRS besteht aus einer inneren und äußeren Komponente (Arredondo Zamarripa et al. 2014). Die innere BRS wird von den mit Müller-Gliazellen, Astrozyten und Perizyten umhüllten Endothelzellen retinaler Gefäße gebildet (Yao et al. 2014). Die äußere BRS besteht aus den durch Tight-Junctions fest verbundenen retinalen Pigmentepithel (RPE)-Zellen (Park et al. 2014). Da das Pferd eine überwiegend avaskuläre Retina besitzt, stellt das RPE die immunologische und mechanische Barriere zwischen der Choroidea und dem Augeninneren beim Pferd dar (Szober et al. 2012). Der Zusammenbruch dieser Barriere konnte bei an ERU erkrankten Pferden eindeutig nachgewiesen werden (Deeg et al. 2002a). Jedoch sind die an den RPE-Zellen ablaufenden pathophysiologischen Mechanismen, welche den bei der ERU stattfindenden Übertritt der T-Lymphozyten erlauben, noch weitestgehend ungeklärt. Gerade Expressionsänderungen von RPE-Oberflächenproteinen könnten durch ihre ständige Interaktion und Kommunikation mit benachbarten Zellen und Mediatoren des Immunsystems entscheidend an der Pathogenese der ERU beteiligt sein. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, mittels differentieller Proteomanalyse die Unterschiede zwischen dem Oberflächenproteom von RPE-Zellen gesunder Pferde und an ERU erkrankter Pferde aufzudecken. In einer vorherigen Studie wurde bereits das Zelloberflächenproteom von nativen und kultivierten RPE-Zellen gesunder Pferde

verglichen (Szober et al. 2012). Mittels Biotinylierung wurden die Zelloberflächenproteine angereichert und anschließend in einem Tandemmassenspektrometer mit vorangeschalteter Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS) untersucht (Szober et al. 2012). Dabei konnte eine grundlegende Änderung des Zelloberflächenprofils zwischen nativen und kultivierten RPE-Zellen detektiert werden. Durch die veränderten Bedingungen von der nahezu *in vivo* hin zu der *in vitro* Situation, waren nur noch 45 % der in nativen Zellen exprimierten Zelloberflächenproteine bei den kultivierten Zellen wiederzufinden. Es gelang zudem der Nachweis, dass die kultivierten Zellen ihr Expressionsmuster dahingehend veränderten, dass sie vermehrt Proteine mit funktionellen Eigenschaften wie Zelladhäsion und Zellkommunikation exprimierten und sich somit zunehmend an die *in vitro* Situation angepasst hatten (Szober et al. 2012). Vergleichende Untersuchungen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese in Kombination mit matrixunterstützter Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (MALDI-TOF MS) von nativen und kultivierten humanen RPE-Zellen zeigten ebenfalls kulturbedingte Veränderungen im Proteom der kultivierten RPE-Zellen des Menschen (Alge et al. 2003). Diese kulturbedingte proteomische Dedifferenzierung von Zelllinien schränkt die Eignung dieser Zellen als Untersuchungsmodell für *in vivo* Geschehnisse erheblich ein. Um so nah wie möglich an den am RPE *in vivo* stattfindenden physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zu bleiben, führten wir deshalb zur Anreicherung von Zelloberflächenproteinen von RPE-Zellen eine neuartige *in situ* Biotinylierungsmethode durch. Die so angereicherten Zelloberflächenproteine wurden anschließend ungelabelt mittels LC-MS/MS analysiert und zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden verglichen. Diese erstmals von uns durchgeführte *in situ* Biotinylierung mit anschließender LC-MS/MS ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 148 Proteinen. Davon wurden sechs Proteine nur bei gesunden Proben und ein Protein nur bei uveitischen Proben detektiert. Unter den 148 insgesamt identifizierten Proteinen befanden sich 81,8 % Plasmamembranproteine, was für den Erfolg der neuartigen Anreicherungsmethode sprach. Auch die Identifikation vieler typischerweise vom RPE exprimierten Proteine wie RPE65, 11-cis-Retinal-Dehydrogenase und IRBP (Interphotoreceptor retinoid-binding protein), welche allesamt wichtige Proteine des Sehzyklus darstellen (Muniz et al. 2014), sowie Basigin, S-Arrestin, Na⁺/K⁺-ATPase und Transporter wie der Glukosetransporter 1

(GLUT-1) zeigte, dass es sich um einen validen Datensatz handelt (Publikation I, Supplemental Table 3, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.020>). Ein Großteil dieser Proteine wurde auch in der Plasmamembran von nativen humanen RPE-Zellen detektiert, welche mittels unterschiedlicher Zentrifugationseinstellungen in eine Zytosol-, Mikrosomen- und Membranfraktion separiert und anschließend durch eindimensionale (1D) oder zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese aufgetrennt wurden (West et al. 2003). Die Gelbanden oder Gelspots wurden folglich mittels MALDI-TOF/TOF MS oder LC-MS/MS analysiert (West et al. 2003). Insgesamt konnten dabei 278 Proteine identifiziert werden, darunter 52 Plasmamembranproteine wie z.B. RPE65, S-Arrestin und Basigin (West et al. 2003). Unseres Wissens sind wir die ersten, die differentiell regulierte Proteine des RPEs in Verbindung mit Uveitis untersucht haben (Pubmed Recherche Stand 16.03.2015). Mit der neuen *in situ* Anreicherungs- und Analyse-Methoden von Oberflächenproteinen mit anschließender labelfreier LC-MS/MS konnten wir bei 27 von den insgesamt 148 identifizierten Proteinen eine unterschiedliche Expression zwischen gesundem und uveitischem RPE quantifizieren (Publikation I, Tabelle 1 und 2). Aufgrund der begrenzten Anzahl an Proben im Discovery-Experiment musste zunächst kritisch betrachtet werden, ob die ausgewählten Stichproben das Expressionsmuster der equinen gesunden sowie uveitischen RPE-Oberflächenproteine repräsentativ widerzuspiegeln vermochten. Die Repräsentativität der Ergebnisse des Discovery-Ansatzes konnte jedoch später durch die Verifikation von vier Kandidatenproteinen mittels einer ausreichenden Anzahl an Proben in weiterführenden Analysen bestätigt werden (Publikation I und II).

Interessanterweise waren von den insgesamt 27 differentiell regulierten Proteinen 24 in uveitischem RPE herunterreguliert und nur drei Proteine, welche alle Mediatoren des Immunsystems sind, hochreguliert. Teilt man die Proteine in die vier Gruppen „Transportproteine, Enzyme, Rezeptoren und Sonstige“ nach Almen et al. ein, so fällt auf, dass die Mehrzahl der herunterregulierten Proteine den „Transportproteinen“ angehört, so wie z.B. GLUT-4, die Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat (ADP/ATP) Translokase 2, der Na²⁺/Cl⁻ abhängige GABA Transporter 2 und die Na²⁺/K⁺ ATPase beta 2 (Publikation I, Tabelle 2) (Almen et al. 2009). Aber auch Proteine der Gruppe „Enzyme“ (z.B. Malat-Dehydrogenase und RPE65), „Rezeptoren“ (z.B. Rhodopsin und CD44) sowie Proteine der Gruppe „Sonstige“ (z.B. Synaptotagmin 1 und Peripherin 2) sind vertreten. Die auffällig hohe Anzahl an

herunterregulierten Proteinen im Vergleich zu den hochregulierten Proteinen in uveitischem RPE könnte zunächst zu der Überlegung führen, dass es sich aufgrund von bereits zerstörten RPE-Strukturen um eine allgemeine Degradation der Proteine in den ERU Proben handelt. Da von den insgesamt 148 identifizierten Proteinen 114 Proteine, darunter typische RPE Proteine, in gesundem wie in uveitischem RPE gleich stark reguliert waren, konnte von einem noch intakten uveitischen RPE ausgegangen werden. Die klare Verifikation der verminderten Expression unserer vier Kandidatenproteine in uveitischen Gewebeschnitten mit noch intaktem RPE widerlegte dann deutlich eine bloße Degradation der Proteine in den uveitischen Proben bei der Proteomanalyse. So kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Studie *in situ* identifizierten herunterregulierten ebenso wie die hochregulierten Proteine den pathophysiologischen Zustand der RPE-Zellen im Zuge der ERU reflektieren.

Die drei in uveitischem RPE hochregulierten Proteine Komplementfaktor C3, Immunglobulin der Klasse G (IgG) 5 und IgG7 (Publikation I, Tabelle 1) spiegeln dabei sehr gut das immunmedierte Geschehen der ERU wider, da alle drei Proteine funktionell dem Immunsystem zuzuordnen sind. Der Komplementfaktor C3 gehört den löslichen Faktoren des angeborenen Immunsystems und IgG5 und IgG7 den löslichen Faktoren des erworbenen Immunsystems an. Die in dieser Studie detektierte erhöhte Expression von Komplementfaktor C3 in uveitischen RPE-Zellen (Publikation I, Tabelle 1) reiht sich als zentraler Faktor des Komplementsystems sehr gut in die von unserer Arbeitsgruppe bereits als differentiell exprimiert identifizierten Komponenten des Komplementsystems im Zuge der ERU ein (Deeg et al. 2007a, Hauck et al. 2012, Hauck et al. 2007, Zipplies et al. 2009, Zipplies et al. 2010a, Zipplies et al. 2010b). Der Komplementfaktor C3 und andere dem Komplementsystem angehörige Proteine konnten mittels LC-MS/MS im Vergleich zu Kontrollen in uveitischen Glaskörperproben in deutlich erhöhter Konzentration detektiert werden (Hauck et al. 2012). Des Weiteren wies der Vergleich von Serum gesunder Pferde mit dem von an ERU erkrankten Pferden mittels 2D Gelelektrophorese und anschließender Analyse der Gelspots mittels MALDI-TOF/TOF einen erhöhten Plasmaspiegel von Komplementfaktor B bei an ERU erkrankten Pferden auf (Zipplies et al. 2010b). Zudem konnte ein Anstieg der Spaltprodukte iC3b, C3d, B/Ba, B/Bb und Bb-Neoantigen in uveitischen Seren mittels Dot-Blot Analysen nachgewiesen werden (Zipplies et al. 2010b). Auch im Zielorgan

Retina wurden bei an ERU erkrankten Pferden im Gegensatz zu Kontrollen die Spaltprodukte C3d und Bb-Neoantigen gefunden (Zipplies et al. 2010b). Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte gezeigt werden, dass infiltrierende Zellen im uveitischen Glaskörper, welche positiv für die Spaltprodukte des Komplementsystems waren, den Makrophagenmarker CD68 exprimierten (Zipplies et al. 2010b). So konnte zusätzlich zur Aktivierung des Komplements auch eine neuartige Verbindung zwischen Makrophagen und dem Komplementsystem, welche an den immunologisch stattfindenden Prozessen der ERU beteiligt ist, in uveitischen Augen nachgewiesen werden (Zipplies et al. 2010b). Die Entstehung der Spaltprodukte von Komplementfaktor C3 stellt das zentrale Ereignis bei der Aktivierung des Komplementsystems dar (Mathern and Heeger 2015). Physiologischerweise wird dieser Vorgang strikt durch regulatorische Proteine, wie den Zerfalls-Beschleunigungs-Faktor CD55 reguliert, um körpereigene Zellen vor entzündlichen Angriffen zu schützen (Mathern and Heeger 2015, Ricklin et al. 2010). Kommt es dennoch zu Dysregulationen im Komplementsystem, kann dies zu Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematodes, Multipler Sklerose und Morbus Crohn führen (Leffler et al. 2014, Ramaglia et al. 2015, Sandahl et al. 2014). Auch im Serum von Ratten mit experimentell durch IRBP induzierter Uveitis wurde mittels LC-MS/MS ein erhöhter Plasmaspiegel an Komplementfaktor C3 im Vergleich zu Kontrollen gemessen (Guo et al. 2015). Bei anderen Augenerkrankungen, wie z.B. der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) trägt die Dysregulation des Komplementsystems ebenso entscheidend zur Pathogenese der retinalen Erkrankung bei (Bora et al. 2015). So beinhalten z.B. Drusen (Ansammlungen von Abbauprodukten des retinalen Stoffwechsels), welche die ersten klinischen Anzeichen der AMD darstellen, Proteine des Komplementsystems (Smailhodzic et al. 2014). Dies lässt darauf schließen, dass die Drusen an einer lokalen Komplementsystem-medierten Entzündung in der AMD beteiligt sind (Smailhodzic et al. 2014). Für mehrere Gene des Komplementsystems, wie z.B. die der Komplementfaktoren C3 und B, wurde des Weiteren ein Polymorphismus festgestellt, welcher mit der Ausbildung und dem Verlauf der AMD in Assoziation gebracht werden konnte (Schramm et al. 2014). Zudem wurde, wie auch bei ERU-Patienten, bei AMD-Patienten ein erhöhter Spiegel an aktivierenden Komplementsystemfaktoren im Serum nachgewiesen (Reynolds et al. 2009). Die genauen Mechanismen, wie das Komplementsystem an der Pathogenese der oben

genannten Krankheiten beteiligt ist, konnten bislang nicht vollständig geklärt werden. Jedoch ist bekannt, dass die Ablagerungen von Komplementfaktoren C3 und C3b auf Zielzellen mit einer Bildung von C3a und C5 und dem Membranangriffskomplex (MAC) einhergehen, was zur Entzündung und Zellyse führt (Smailhodzic et al. 2014). Eine solche Ablagerung von Komponenten des Komplementsystems wie den Komplementfaktoren C3, B, H und dem MAC konnte mit einem lichtinduzierten Retinopathie-Modell an Ratten-RPE-Zellen gezeigt werden und ging letztendlich mit dem Verlust der RPE-Zellen einher (Collier et al. 2011). Die erhöhte Expression von Komplementfaktoren, wie dem Komplementfaktor C3, konnten bei der humanen RPE-Zelllinie ARPE-19 mittels eines *in vitro* Ko-Kultur-Systems detektiert werden, bei dem die Genexpression von ARPE-19 Zellen auf die von aktivierten humanen T-Lymphozyten sekretierten löslichen Faktoren untersucht wurde (Juel et al. 2011). So ist es denkbar, dass es auch bei der ERU am RPE durch Stimulation von autoaggressiven T-Zellen zu einer vermehrten Expression des Komplementfaktors C3 kommt, welcher dann zur Bildung von C3a, C5 und MAC führt, was wiederum zur Entzündung und Zellyse und somit zu einer beschädigten BRS führen könnte. Um mehr Informationen über die Beteiligung des Komplementfaktors C3 an der Pathogenese der ERU zu erhalten, wäre es denkbar, die Expression von Komplementfaktoren eines equinen RPE-Monolayers auf die Exposition löslicher Faktoren von aktivierten T-Zellen hin zu untersuchen und die Struktur des RPE-Monolayers auf Durchlässigkeit zu überprüfen und immunhistologisch zu analysieren. Zusätzlich zum Komplementfaktor C3 konnten in dieser Studie noch zwei weitere Proteine in RPE-Zellen von an ERU erkrankten Pferden als hochreguliert identifiziert werden. Diese waren IgG5 und IgG7 (Publikation I, Tabelle 1). Immunglobuline werden vorwiegend im Zuge der humoralen erworbenen Immunantwort von Plasmazellen gebildet, binden Antigene und aktivieren somit andere Komponenten des Immunsystems, wie das Komplementsystem und andere Effektorzellen. Somit sind sie entscheidend an der Beseitigung und Zerstörung von Pathogenen beteiligt. Während der Mensch vier IgG-Subklassen besitzt, IgG1-IgG4, sind heute beim Pferd sieben Subklassen bekannt, IgG1-IgG7 (Wagner 2006). Eine Expression von IgG in equinen RPE-Zellen wurde bisher noch nicht beschrieben (Pubmed Recherche Stand 16.03.2015). In RPE-Zellen von Mäusen sowie in ARPE-19 Zellen konnte jedoch eine endogene IgG-Expression nachgewiesen werden (Niu et al. 2011, Niu et al. 2013). Es wurde gezeigt, dass das von RPE-Zellen produzierte IgG an der

Proliferation, Apoptose, Mitose und Migration von ARPE-19 Zellen beteiligt ist und zudem einen positiven Effekt auf den TLR (Toll-like Rezeptor)-4 Signalweg, der zur Regulation der angeborenen Immunantwort beiträgt, ausübt und somit eine entscheidende Rolle in der Immunantwort von RPE-Zellen einnimmt (Niu et al. 2013). Eine solche endogene Expression könnte auch das Vorhandensein von IgG5 und IgG7 in equinen RPE-Zellen erklären, es wäre jedoch auch denkbar, dass es wie bei der proliferativen Glomerulonephritis mit monoklonalen IgG Ablagerungen, zu einer Ablagerung von IgG auf RPE-Zellen kommt (Fatima et al. 2014). Die mögliche Expression von IgG5 und IgG7 in equinen RPE-Zellen auf mRNA-Ebene könnte z.B. mittels PCR analysiert werden. Eine differentiell regulierte Expression oder Konzentration von IgG-Isotypen in oder auf RPE-Zellen im Zuge der ERU konnte bisher noch nicht festgestellt werden, jedoch wurden in vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe bereits erhöhte Konzentrationen von IgG-Isotypen, darunter auch IgG7, in uveitischen Seren, Retinae und Glaskörpern nachgewiesen (Deeg et al. 2007a, Deeg et al. 2001, Hauck et al. 2007, Zipplies et al. 2009). Aufgrund fehlender geeigneter Isotyp-spezifischer Antikörper wurden bislang nur wenig funktionelle Daten über die IgG-Isotypen beim Pferd erzeugt. So konnte noch nicht einheitlich geklärt werden, zur Bildung welches IgG-Isotyps die einzelnen T-Helfer-Zell (Th)-Antworten führen. Durch Injektion eines modifizierten EHV (Equines Herpesvirus) 1-Lebendimpfstoffs wurde bei Pferden vornehmlich die Bildung von IgG1, IgG2, IgG4 und IgG7 induziert, die daraufhin in Verbindung mit einer Th1-Zellantwort gebracht wurden (Goodman et al. 2006). Bei Pferden, die nach Ausbildung einer protektiven Immunantwort auf eine EHV4-Infektion anschließend mit EHV1 infiziert wurden, konnte diese Th1-Immunantwort bestätigt werden (Bannai et al. 2011). Demgegenüber wurde in einer Studie über die Immunreaktion von Fohlen und erwachsenen Pferden auf Virulenz-assoziierte Proteine von *Rhodococcus Equi*, die gebildeten Immunglobuline IgG3, IgG5, IgG4 und IgG7 einer Th2-Zellantwort zugeordnet (Hooper-McGrevy et al. 2003). Übereinstimmend konnten IgG1 und IgG2 einer Th1-Zellantwort und IgG3 und IgG5 einer Th2-Zellantwort zugeordnet werden (Bannai et al. 2011, Goodman et al. 2006). Für IgG4 und IgG7 gibt es hingegen widersprüchliche Daten, sie wurden sowohl der Th1- als auch der Th2-Zellantwort zugeordnet. Da die ERU eine Th1-mediierte Autoimmunerkrankung ist (Gilger et al. 1999) und wir in dieser Studie ein vermehrtes Vorkommen von IgG5 und IgG7 auf uveitischem RPE identifizieren konnten, könnte dies darauf hindeuten, dass IgG5

und IgG7 vielmehr der Th1-Zellantwort des Pferdes zugehörig sind. Dies könnte überprüft werden, indem periphere Blutlymphozyten von Pferden mit Zytokinen der Th1-Zellantwort, z.B. Interferon gamma, stimuliert werden und der Überstand auf eine erhöhte Konzentration von IgG5 und IgG7 untersucht wird. Mit Hilfe der von unserer Arbeitsgruppe erst kürzlich hergestellten eigenen monoklonalen Antikörper gegen die sieben IgG-Isotypen des Pferdes werden solche Untersuchungen zur Zuordnung der IgG-Isotypen zu den T-Helfer-Zellantworten und auch weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Funktion von IgG5 und IgG7 beim Pferd auch in Hinblick auf die RPE-Zellen in Zukunft durchgeführt.

Den drei in uveitischen RPE-Zellen hochregulierten Proteinen Komplementfaktor C3, IgG5 und IgG7 (Publikation I, Tabelle 1) standen insgesamt 24 herunterregulierte Proteine gegenüber (Publikation I, Tabelle 2). Unter diesen befanden sich, wie oben erwähnt, vermehrt Transportproteine. Eines dieser Transportproteine war GLUT-4, welcher um das 77,9-fache geringer in uveitischem RPE im Vergleich zu Kontrollen exprimiert war (Publikation I, Tabelle 2). Unseres Wissens ist dies die Erstbeschreibung von GLUT-4 in RPE-Zellen (Pubmed Recherche Stand 16.03.2015). Die in der Literatur bislang in verschiedenen Spezies, wie z.B. Ratte und Huhn, beschriebenen Glukosetransporter im RPE sind vor allem GLUT-1 und GLUT-3 (Ban and Rizzolo 2000, Strauss 2005). GLUT-4 ist normalerweise intrazellulär in Muskel- und Fettzellen lokalisiert und verlagert sich von dort nach Insulinstimulation an die Zelloberfläche, von wo er Glukose aus dem extrazellulären Milieu in das Zellinnere transportiert (Govers 2014). So spielt er für den physiologischen Zuckerhaushalt eine bedeutende Rolle, aber z.B. auch für die Pathogenese der Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ II (Govers 2014). In RPE-Zellen wurde GLUT-4 zwar bisher noch nicht beschrieben, doch konnte es in den Photorezeptoren der inneren Körnerschicht und in der Ganglienzellschicht von Ratten und Fröschen mittels immunhistologischer Untersuchungen detektiert werden (Sanchez-Chavez et al. 2012). Die Erstbeschreibung von GLUT-4 in equinem RPE macht deutlich, dass beim Pferd, anders als bei anderen Spezies, die Versorgung der RPE-Zellen selbst sowie auch die Versorgung der retinalen Strukturen mit Glukose über GLUT-1 und GLUT-4 gesichert ist. In uveitischem RPE könnte diese Versorgung durch die verminderte Expression von GLUT-4 eingeschränkt sein, was so zuvor noch nicht für Uveitiden beschrieben wurde. Eine erniedrigte GLUT-4-Expression konnte jedoch kürzlich in Retinae von Hühnerembryonen mit induzierter

diabetischer Retinopathie nachgewiesen werden, was als Bestätigung eines gelungenen Hühnermodells für die diabetische Retinopathie angesehen wurde, da auch schon in mit Streptozotocin induzierten diabetischen Rattenmodellen Veränderungen der GLUT-4-Expression gezeigt wurden (Shi et al. 2014). Die Expression von GLUT-4 in RPE-Zellen gesunder und an ERU erkrankter Pferde sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden, da die erniedrigte Expression von Glukosetransportern im RPE schwerwiegende Folgen für die Energieversorgung der Photorezeptoren und damit der Aufrechterhaltung des Sehvermögens haben könnte.

Ein weiteres Protein, welches in dieser Studie in uveitischen RPE-Zellen herunterreguliert war, ist RPE65 (Publikation I, Tabelle 2). Es ist bekannt, dass RPE65 in den meisten RPE-Zelllinien nicht mehr vorhanden ist, da es, sobald RPE-Zellen in Kultur genommen werden, nicht mehr exprimiert wird (Alge et al. 2003, Milyushina et al. 2012, Szober et al. 2012). Eine Ausnahme hiervon bildet die RPE-Zelllinie ARPE19 (Ahmado et al. 2011). Die Identifizierung von RPE65 mittels unserer neuartigen *in situ* Biotinylierungsmethode mit anschließender LC-MS/MS bestätigt daher, dass die in dieser Studie identifizierten Proteine und ihre differentielle Regulation zwischen gesundem und uveitischem RPE sehr gut die sich *in vivo* abspielenden physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge am RPE widerspiegeln, da wir RPE65 im gesunden RPE klar nachweisen konnten. RPE65 katalysiert die Hydrolyse und die Isomerisierung des all-trans-Retinylesters in 11-cis-Retinol und nimmt so eine entscheidende Rolle im Sehzyklus ein (Muniz et al. 2014). Durch diese wichtige Funktion ist auch RPE65 ein Protein, bei dem eine veränderte Expression in RPE-Zellen zu erheblichen Einschränkungen des Sehvermögens führen kann. So ist bekannt, dass Mutationen im RPE65-Gen zu mit starkem Sehverlust einhergehenden degenerativen retinalen Erkrankungen, wie Leber'scher kongenitaler Amaurose und anderen Formen der Retinitis Pigmentosa führen (Ozaki et al. 2014, Ripamonti et al. 2014). Betroffene Patienten dieser retinalen Erkrankungen zeigen eine deutliche Degeneration der Photorezeptoren und Schäden des RPE-Monolayers mit Drusen-ähnlichen Ablagerungen, Hyperpigmentation und erhöhter Granularität (Galvin et al. 2005, Lorenz et al. 2000). Bisher konnte eine veränderte Expression von RPE65 noch nicht für die ERU nachgewiesen werden, jedoch konnte ein stark uveitogenes Potential von RPE65 für die experimentelle autoimmune Uveitis (EAU) gezeigt werden (Ham et al. 2002). Durch die

Immunisierung von verschiedenen Rattenstämmen mit RPE65 konnte bei allen Ratten eine EAU induziert werden, was sowohl klinisch als auch histologisch nachgewiesen wurde (Ham et al. 2002). Daraus ergab sich für die Autoren die Hypothese, dass eine Autoimmunität gegen RPE65 an der Ätiologie und Pathogenese von Uveitiden beteiligt sein könnte (Ham et al. 2002). Die funktionelle Bedeutung des herunterregulierten RPE65 und die Ursache wie es zu dieser verringerten RPE65-Expression im RPE von an ERU erkrankten Pferden kommt, muss in weiteren Studien genauer untersucht werden. Eine mögliche Erklärung für die geringere Expression von RPE65 in uveitischem RPE von Pferden könnte, in Hinblick auf die festgestellte Autoimmunität gegen RPE65 bei Ratten, eine autoimmune Attacke von autoreaktiven T-Zellen gegen RPE65 sein.

Interessanterweise konnte in dieser Studie ein weiteres in RPE von an ERU erkrankten Pferden herunterreguliertes Protein gefunden werden, welches in vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe als Autoantigen der ERU identifiziert wurde. Dabei handelt es sich um das Protein S-Arrestin, auch S-Antigen genannt (Publikation I, Tabelle 2). Die Untersuchung von Glaskörpern gesunder und an ERU erkrankter Pferde auf gegen S-Arrestin und IRBP gerichtete Autoantikörper ergab ein Vorkommen dieser Autoantikörper in 72 % der Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden, wohingegen in gesunden Glaskörpern keine Antikörper gefunden wurden (Deeg et al. 2001). Des Weiteren konnte eine starke Proliferation von vitrealen Zellen nach Stimulation mit S-Arrestin detektiert werden (Deeg et al. 2001). Eine wichtige Rolle spielt S-Arrestin auch in Hinblick auf das für die ERU bewiesene inter- und intramolekulare Spreading (Deeg et al. 2006a, Deeg et al. 2004). So konnte bei Pferden mit IRBP-induzierter Uveitis ein intermolekulares Spreading von der initialen T-Zellantwort gegen IRBP auf eine folgende T-Zellantwort gegen S-Arrestin gezeigt werden (Deeg et al. 2002b). Intramolekulares Spreading wurde mittels Untersuchungen zur T-Zell-Proliferation von an ERU erkrankten Pferden auf verschiedene S-Arrestin-Peptide bewiesen (Deeg et al. 2006a). Die EAU der Lewis-Ratte wird sehr häufig mit dem bei der Ratte hoch uveitogenen S-Arrestin induziert (Osada et al. 2014). So wurde auch bei Pferden mittels subkutaner Immunisierung mit S-Arrestin das uveitogene Potential dieses Autoantigens untersucht (Deeg et al. 2004). Dabei konnte nur bei einem von fünf Pferden eine Uveitis induziert werden, wobei die Immunisierung mit S-Arrestin bei allen fünf Pferden die Bildung von autoreaktiven T- und B-Zellen bewirkte (Deeg et al. 2004). Genau wie bei der

verminderten Expression von RPE65 stellt sich auch bei S-Arrestin die Frage, wie es zu dieser herabgesetzten Expression kommt und welche funktionelle Wichtigkeit sie für das RPE und dessen Bedeutung in der Pathogenese der ERU haben könnte. Eine Erklärung für die verminderte Expression könnte wiederum darin zu finden sein, dass S-Arrestin durch autoreaktive T-Lymphozyten angegriffen und zerstört wird und die RPE-Zellen nicht in der Lage sind, die physiologische Konzentration von S-Arrestin aufrecht zu erhalten. Die andere Möglichkeit, die in Betracht gezogen werden kann, wäre ein sekundär bedingtes verringertes Vorkommen von S-Arrestin aufgrund zuvor zerstörter RPE-Strukturen im Verlauf der ERU. Immunhistologische Untersuchungen von uveitischen, aber dennoch intakten RPE-Zellen im Vergleich zu gesunden RPE-Zellen könnten eine Antwort auf die Frage nach primär oder sekundär vermindertem S-Arrestin in uveitischem RPE liefern.

Von den insgesamt 24 herunterregulierten Proteinen, die wir in dieser Studie identifizieren konnten, weckten vier Proteine, Synaptotagmin 1, Basigin, Collectrin und Peripherin 2 aufgrund ihrer spannenden Funktionen, Lokalisationen oder Beteiligungen an retinalen Augenerkrankungen unser besonderes Interesse. Interessanterweise ergab die Analyse der Funktionsbereiche der vier Proteine mittels der Genomatix Software (<https://www.genomatix.de/>, Recherche 16.03.2015) für alle Proteine eine Beteiligung an „Visual Functions“ und „Immunological Diseases“. So habe ich diese vier Proteine in weiteren Untersuchungsschritten genauer charakterisiert und konnte zunächst die Expression in gesundem und uveitischem RPE verifizieren. In einer ersten Untersuchungsreihe dazu wurden Synaptotagmin 1, Basigin und Collectrin eingehender betrachtet (Publikation I). Für jedes dieser drei Proteine konnte sowohl mittels durchflusszytometrischer Messungen, als auch immunhistologischer Färbungen der zuvor massenspektrometrisch identifizierte Expressionsrückgang der Proteine in uveitischem RPE klar verifiziert werden.

Synaptotagmin 1 ist ein N-glykosiliertes Transmembranprotein, welches mit seinen zwei C-terminalen C2-Domänen die Fähigkeit besitzt, Calcium zu binden und somit als Calciumsensor agiert (Lin et al. 2014). Es initiiert durch Interaktionen mit dem SNARE-Komplex die calciumabhängige Fusion von Neurotransmitter-Vesikelmembranen mit der Zellmembran und ist somit entscheidend an Endo- und Exozytosevorgängen beteiligt (Del Prete et al. 2014). Es ist bekannt, dass Synaptotagmin 1 in Neuronen des Gehirns und Gliazellen lokalisiert ist (Glavan et al. 2009). Unseres Wissens nach wurde Synaptotagmin 1 bislang nicht in RPE-Zellen

beschrieben (Pubmed Recherche Stand 16.03.2015). Mittels immunhistologischer Färbungen konnte im Zuge dieser Studie gezeigt werden, dass Synaptotagmin 1 in gesundem equinen RPE über die gesamte Zelle gleichmäßig verteilt war (Publikation I, Abbildung 2B), wohingegen die Expression in uveitischem equinem RPE stark zurückging und vornehmlich in Randgebieten der RPE-Zellen zu finden war (Publikation I, Abbildung 2D). Die verminderte Expression von Synaptotagmin 1 in uveitischem RPE wurde quantifiziert und ein Rückgang auf 63,5 % im Vergleich zu physiologischem RPE nachgewiesen (Publikation I, Abbildung 5A). In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde Synaptotagmin 1 als plasmamembranständiges Autoantigen bei der ERU identifiziert (Swadzba et al. 2012a). Zur Gewinnung von Membranproteinen der Retina wurden dabei retinale Glykoproteine durch Concanavalin A angereichert und anschließend die Antikörperbindung gesunder und an ERU erkrankter Pferde an diese Präparation untersucht. Dabei zeigte sich, dass mehrere ERU-Pferde Antikörper gegen ein unbekanntes Protein aus dieser Präparation aufwiesen (Swadzba et al. 2012a). Das Protein wurde aus der Blotmembran ausgeschnitten, massenspektrometrisch analysiert und als Synaptotagmin 1 identifiziert (Swadzba et al. 2012a). Validiert wurde Synaptotagmin 1 als hochprävalentes Autoantigen der ERU mittels eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) (Swadzba et al. 2012a). Interessanterweise konnte bei der weiteren Charakterisierung von Synaptotagmin 1 eine signifikant verminderte Expression von Synaptotagmin 1 in uveitischer Retina gezeigt werden, wie sie auch in dieser Studie in uveitischem RPE detektiert wurde (Swadzba et al. 2012a). Sowohl in der Studie zu Synaptotagmin 1 als retinales Autoantigen der ERU als auch in unserer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die verminderte Expression von Synaptotagmin 1 in der Retina und in RPE-Zellen von an ERU erkrankten Pferden unabhängig von einer Zerstörung der physiologischen Gewebestrukturen ist, da die untersuchten uveitischen Retinae und die RPE-Monolayer noch voll intakt waren (Publikation I, Abbildung 2C und D) (Swadzba et al. 2012a). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Reduktion der Synaptotagmin 1-Expression in uveitischen Retinae auf ein aktives Geschehen zurückzuführen ist (Swadzba et al. 2012a). Diese Hypothese wird durch die aktuell gefundene verminderte Expression von Synaptotagmin 1 in uveitischem aber dennoch intaktem RPE bekräftigt, wobei die genaue Ursache der Reduktion weiterhin unbekannt bleibt. Interessanterweise konnte eine verminderte Expression von

Synaptotagmin 1 auch bei Alzheimer-Patienten in verschiedenen Gehirnregionen detektiert werden, was für fehlerhafte Schaltungen der Synapsen im Gehirn von Alzheimer-Patienten verantwortlich gemacht wurde (Mufson et al. 2002, Reddy et al. 2005, Yoo et al. 2001). Wie auch schon in Bezug auf die Retina von unserer Arbeitsgruppe angeführt (Swadzba et al. 2012a), könnte die verminderte Expression von Synaptotagmin 1 in der Retina und im RPE von an ERU erkrankten Pferden aus einer Zerstörung des Proteins durch attackierende Autoantikörper resultieren. Auch eine Dysregulation von bisher unbekanntem Faktoren, die auf die Expression von Synaptotagmin 1 Einfluss nehmen, könnte für die verminderte Expression von Synaptotagmin 1 verantwortlich sein (Swadzba et al. 2012a). Zusätzlich könnte eine durch ständigen zellulären Stress verminderte Fähigkeit der Zellen, das Synaptotagmin 1 zu rekonstituieren entscheidend an der verminderten Expression von Synaptotagmin 1 beteiligt sein (Swadzba et al. 2012a). Diese möglichen Ursachen sowie die funktionelle Bedeutung der verminderten Expression von Synaptotagmin 1 müssen in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

Das zweite von uns näher charakterisierte Protein, welches in uveitischem RPE niedriger im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert war, ist Basigin (Publikation I, Tabelle 2). Basigin gehört zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie und ist an vielen interessanten Funktionen, auch in Hinblick auf das RPE, wie z.B. der Zelladhäsion und dem Laktattransport, beteiligt (Grass et al. 2014, Nishibaba et al. 2012, Philp et al. 2003b). Basigin wurde schon in einer früheren Studie von unserer Arbeitsgruppe in der Zelloberflächenmembran von Pferde-RPE-Zellen entdeckt, jedoch nicht näher charakterisiert (Szober et al. 2012). Deshalb haben wir im Zuge der aktuellen Studie die Lokalisation von Basigin in gesundem sowie in uveitischem equinen RPE mittels immunhistologischer Färbungen genauer untersucht (Publikation I, Abbildung 3). In gesundem RPE war Basigin deutlich basolateral im RPE polarisiert, also vermehrt zur Seite der Bruch'schen Membran und zu benachbarten RPE-Zellen hin (Publikation I, Abbildung 3B). Demgegenüber wurde Basigin im RPE von adulten Ratten vermehrt apikal detektiert, also auf der Seite hin zu den Photorezeptoren (Marmorstein et al. 1998). Bei Menschen, Mäusen und Hühnern wiederum wird Basigin sowohl apikal als auch basolateral exprimiert (Philp et al. 2003a, Philp et al. 2003b). Warum das Pferd eine andere Polarität von Basigin im RPE aufweist als die bisher untersuchten anderen Spezies, ist unklar. Eine Erklärung hierfür könnte in der Sonderstellung des Pferdes in Hinblick auf die fast

vollständig avaskuläre Retina im Vergleich zu anderen Spezies zu finden sein. So wäre es denkbar, dass gerade Proteine mit wichtigen Funktionen wie dem Zu- und Abtransport von Stoffen eher zur basolateralen Seite hin nah an der Choroidea exprimiert werden, als zur apikalen Seite des RPEs, welche an die avaskuläre Retina angrenzt. Um diese Hypothese zu bestärken, wäre es interessant die Lokalisation von Basigin im RPE von Kaninchen auf Ähnlichkeiten zum Pferd zu untersuchen, da auch das Kaninchen eine weitestgehend avaskuläre Retina besitzt (Yu and Cringle 2001). Daraus ließe sich auch eine Erklärung für die Lokalisationsänderung von Basigin im uveitischen RPE ableiten. Im RPE von an ERU erkrankten Pferden war eine deutliche Reduktion der Basigin-Expression feststellbar (Publikation I, Abbildung 3D). Die Quantifikation der Fluoreszenzintensitäten von Basigin in gesundem und uveitischem RPE ergab einen signifikanten Rückgang der Basigin-Expression im uveitischen RPE auf 28,4 % (Publikation I, Abbildung 5B). Des Weiteren war eine deutliche Lokalisationsänderung von Basigin im RPE von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu erkennen (Publikation I, Abbildung 3). Die in gesunden Zellen deutliche basolateral nachweisbare Polarität war im uveitischen RPE nicht mehr detektierbar (Publikation I, Abbildung 3D). Basigin war in ERU-RPE nunmehr sowohl basolateral, als auch apikal zu finden (Publikation I, Abbildung 3D). Diese im uveitischen RPE auch apikal vorzufindende Expression von Basigin könnte eventuell damit zusammenhängen, dass Basigin über einen heterodimeren Komplex mit Monocarboxylat-Transportern (MCT) interagiert (Deora et al. 2005). MCT sind plasmamembranständige Ko-Transporter für Laktat und H^+ und somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Laktat und pH-Homöostase in vielen Zelltypen (Deora et al. 2005, Li et al. 2014). Auch in RPE-Zellen sind MCT sowohl apikal als auch basolateral lokalisiert (Philp et al. 2003b). Die erniedrigte Expression von Basigin in RPE-Zellen von an ERU erkrankten Pferden könnte somit zu einer Dysregulation des Laktat- und pH-Haushaltes im Auge führen und mit einem Energiemangel und Funktionsverlust der RPE-Zellen einhergehen, was letztendlich eine Degeneration der Photorezeptoren verursachen würde. Um die verminderte Expression von Basigin in uveitischem RPE und die dadurch eventuell vermehrte Ansammlung von Laktat im subretinalen Raum auszugleichen, könnte die Antwort der RPE-Zellen die im Fall der ERU zusätzlich zur basolateralen gezeigte apikale Expression von Basigin sein. Bei Basigin-Knockout-Mäusen wurde der Verlust des Sehvermögens in Zusammenhang mit einer erniedrigten Expression von MCT und

einer folglich möglichen Dysregulation des Laktattransportes diskutiert (Philp et al. 2003a). Der Phänotyp von Basigin-Knockout-Mäusen ist gekennzeichnet durch Kontrast- und Farbsehdefizite und durch eine Degeneration der Photorezeptoren, welche bis hin zur Blindheit führen kann (Hori et al. 2000, Pablo and Ochrietor 2013, Philp et al. 2003a). Veränderungen in den RPE-Zellen dieser Basigin-Knockout-Mäuse konnten nicht detektiert werden (Philp et al. 2003a). Um mehr Informationen über die Funktion von Basigin in uveitischen RPE-Zellen zu erhalten, wäre ein möglicher Ansatz, Laktat-Transportversuche vergleichend durch auf Transwell-Filtern angewachsenen gesunden und uveitischen RPE-Zellen durchzuführen. Zusätzlich könnte man die Lokalisation von Basigin in gesundem equinem RPE betrachten, welches einer erhöhten Laktatkonzentration ausgesetzt ist, um daraufhin möglicherweise eine Lokalisationsänderung von Basigin festzustellen. Eine weitere sehr interessante Funktion von Basigin ist die Beteiligung an Zell-Zelladhäsionen durch die Interaktion von Basigin mit verschiedenen Integrinen in verschiedenen Zellen, wie den Zellen des Zentralen Nervensystems, Endothelzellen, Melanomzellen und RPE-Zellen (Kaushik et al. 2015, Nishibaba et al. 2012, Pennings and Kritharides 2014, Priglinger et al. 2013). So könnte die verminderte Expression von Basigin im Zuge der ERU zum Verlust von Zell-Zellkontakten führen, welche unter anderem über Integrine aufrechterhalten werden. Dies würde eine erhöhte Permeabilität der äußeren BRS bedeuten und somit einen Einstrom von autoreaktiven T-Zellen in das innere Auge erlauben. Wie genau eine verminderte Expression von Basigin funktionell an den pathophysiologischen Vorgängen des RPEs im Laufe der ERU beteiligt ist, muss noch näher geklärt werden. Zusätzlich zur Untersuchung des Laktattransports von RPE-Zellen mit einer veränderten Basigin-Expression könnten auch Permeabilitätsversuche durch Basigin-gesilente RPE-Monolayer durchgeführt werden.

Das dritte Oberflächenmembranprotein, welches mittels der differentiellen Proteomanalyse als herunterreguliert in uveitischen RPE-Zellen identifiziert und anschließend mittels Durchflusszytometrie und Immunhistologie bestätigt werden konnte, war Collectrin (Publikation I, Tabelle 2). Collectrin ist ein glykosiliertes Transmembranprotein, welches vor allem in den Beta-Zellen des Pankreas, im proximalen Tubulus und Sammelrohr der Niere sowie in Gefäßendothelzellen vorkommt (Chu and Le 2014, Pepaj et al. 2014). Auch in RPE-Zellen von Ratten konnte es bereits mittels differentieller Proteomanalyse in nativen RPE-Zellen

detektiert werden, woraufhin die Lokalisation von Collectrin in RPE-Zellen mit einer apikalen und basalen Polarität in RPE-Schnitten von Mäusen bestätigt wurde (Gu et al. 2012). Wir konnten Collectrin zum ersten Mal in equinen RPE-Zellen detektieren. Collectrin war über die gesamte Zelle verteilt und dabei verstärkt basal, apikal und lateral polarisiert (Publikation I, Abbildung 4B). Im RPE von an ERU erkrankten Pferden konnte eine signifikante Reduktion der Collectrin-Expression auf 50 % im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden (Publikation I, Abbildung 5C). Im uveitischen RPE war die Expression von Collectrin nur noch basolateral zu finden (Publikation I, Abbildung 4D). Veränderungen der Collectrin-Expression wurden bisher noch nicht in Zusammenhang mit der ERU oder anderen Uveitiden gebracht, jedoch konnte in einer Studie zur Pathogenese der AMD, in welcher die Lokalisation von Collectrin in RPE-Zellen erstmals beschrieben wurde, eine altersabhängige Änderung des Molekulargewichts von Collectrin festgestellt werden (Gu et al. 2012). Die Autoren dieser Studie stellten die Hypothese auf, dass Collectrin am Aminosäuretransport von RPE-Zellen beteiligt sein könnte (Gu et al. 2012). Eine solche Beteiligung von Collectrin an Transportvorgängen von Aminosäuren konnte später in Collectrin-Knockout-Mäusen beobachtet werden (Cechova et al. 2013). Eine Untersuchung der Augen wurde bei diesen Knockout-Mäusen nicht durchgeführt, jedoch wurde die Aufnahmefähigkeit von L-Arginin in pulmonalen Endothelzellen untersucht und dabei eine Dysregulation des L-Arginin-Transportes festgestellt (Cechova et al. 2013). Dies führte zu einem erhöhten Spiegel an Superoxiden mit folgender Hypertonie, einer erhöhten Salzempfindlichkeit und einem gestörten Drucknatriurese-Mechanismus (Cechova et al. 2013). Interessanterweise wurde eine verminderte Expression von Collectrin, welches auch von Beta-Zellen des Pankreas gespalten und sezerniert wird, in Serum von Patienten mit autoimmunem Diabetes im Vergleich zu Kontrollen gefunden (Pepaj et al. 2014). Um mehr Informationen über die mögliche Beteiligung von Collectrin an den pathophysiologischen Vorgängen des RPEs im Zuge der ERU zu erhalten, müssen weitere Untersuchungen folgen. Ein nächster Schritt hierfür könnte, wie auch von der Arbeitsgruppe zur Untersuchung der AMD durchgeführt, ein Aminosäuretransportversuch mit Collectrin-gesilenctem RPE sein. So könnte durch die fehlende Expression von Collectrin am RPE eine mögliche auftretende Dysregulation des Aminosäuretransports festgestellt werden, die im Falle der ERU zur Anhäufung von Superoxiden oder zu Proteinsynthesestörungen im RPE führen könnte. Zudem

könnte aus der von Pepaj et al. detektierten verminderten Expression von Collectrin in Serum von Patienten mit autoimmunem Diabetes (Pepaj et al. 2014) ein Zusammenhang zwischen der verminderten Collectrin- und GLUT-4-Expression in uveitischem RPE angenommen werden. Um einen solchen Zusammenhang zu überprüfen könnte untersucht werden, ob das Silencing von Collectrin in RPE-Zellen eventuell mit einer verminderten GLUT-4-Expression der RPE-Zellen einhergeht.

Ein weiteres Oberflächenmembranprotein, welches wir in uveitischem RPE als herunterreguliert identifiziert haben, ist Peripherin 2 (Publikation I, Tabelle 2). Peripherin 2 gehört zur Familie der Tetraspanine, kommt typischerweise in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren vor und ist dort entscheidend an deren Bildung und Aufrechterhaltung beteiligt (Conley and Naash 2014). Laut Gene Ontology Terminologie (www.ebi.ac.uk/QuickGO) ist Peripherin 2 unter physiologischen Bedingungen verantwortlich für „Visual Perception“ und „Retina Development“. Diese interessanten funktionellen Eigenschaften von Peripherin 2 und die Tatsache, dass eine Lokalisation von Peripherin 2 unseres Wissens nach zuvor noch nicht in RPE-Zellen beschrieben wurde, veranlasste uns in einer weiteren Studie Peripherin 2 sowohl in Photorezeptoren als auch in RPE-Zellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden mittels Immunhistologie näher zu charakterisieren. In Retinae von gesunden Pferden konnte Peripherin 2 gleichmäßig verteilt in den äußeren Photorezeptorsegmenten detektiert werden (Publikation II, Abbildung 1B). Dieses Expressionsmuster von Peripherin 2 in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren wurde bereits auch schon bei Ratten, Mäusen und Rindern beschrieben (Arikawa et al. 1992, Boesze-Battaglia et al. 2007). Dem schon zu erwartenden Expressionsmuster von Peripherin 2 in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren schloss sich die Bestätigung der mittels LC-MS/MS erstmals entdeckten Lokalisation von Peripherin 2 in RPE-Zellen an. In equinem physiologischem RPE konnten wir eine über die gesamte Zelle verteilte Peripherin 2-Expression detektieren, welche eine leicht erhöhte Intensität in einzelnen punktförmigen Bereichen aufwies (Publikation II, Abbildung 2B). Zudem konnten wir dieses Expressionsmuster auch in Gewebeschnitten physiologischen RPEs des Menschen detektieren (Publikation II, Abbildung 5), wodurch wir unsere Neuentdeckung von Peripherin 2 in RPE-Zellen deutlich untermauern konnten. Da RPE-Zellen jeden Tag ca. 10 % der äußeren Photorezeptorsegmente phagozytieren (Wavre-Shapton et al. 2014) lag es nahe, dass Peripherin 2, welches typischerweise

in den zu phagozytierenden Photorezeptorsegmenten vorliegt, durch Phagozytose in die RPE-Zellen gelangt. Um dieser Theorie nachzugehen, wurden die equinen RPE-Schnitte auf eine mögliche Ko-Lokalisation von Peripherin 2 und dem klassischen Phagozytose Marker Rhodopsin untersucht (Zigler et al. 2011). Rhodopsin war in gesundem RPE auf einzelne punktförmige Bereiche konzentriert (Publikation II, Abbildung 2C). In diesen war eine Ko-Lokalisation von Peripherin 2 und Rhodopsin deutlich zu erkennen (Publikation II, Abbildung 2D). Daraus konnte gefolgert werden, dass die für Rhodopsin und Peripherin 2 positiv gefärbten Bereiche Phagosomen darstellten. Dies sprach dafür, dass Peripherin 2 ebenso wie Rhodopsin von RPE-Zellen durch die Aufnahme von äußeren Photorezeptorsegmenten phagozytiert wird. Diese These wird gestützt durch eine erst kürzlich festgestellte Ko-Lokalisation und Interaktion von Rhodopsin und Peripherin 2 in den äußeren Photorezeptoren, welche in Kombination aus *in vitro* (KEK293-Zellen) und *in vivo* (in Mäuseretina) durchgeführten Ko-Immünpräzipitations- und Fluoreszenz-Resonanzenergietransferversuchen ermittelt wurde (Becirovic et al. 2014). Dabei wurde festgestellt, dass Peripherin 2 eine verbindende Funktion zwischen Rhodopsin und den zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (CNG-Kanäle) einnimmt, und dabei eine starke Bindung mit Rhodopsin eingeht (Becirovic et al. 2014). Da wir Peripherin 2 jedoch nicht nur in Ko-Lokalisation mit Rhodopsin in RPE-Zellen vorgefunden hatten, sondern darüber hinaus auch gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt, war es naheliegend, dass Peripherin 2 nicht nur aufgrund von Phagozytose im RPE lokalisiert ist, sondern auch von den RPE-Zellen selbst exprimiert wird. Um dies wiederum zu überprüfen, haben wir uns die Expression und Lokalisation von Peripherin 2 und Rhodopsin in kultivierten RPE-Zellen in unterschiedlichen Wachstumsstadien angesehen. Während Peripherin 2 in allen Wachstumsstadien der RPE-Zellen detektiert werden konnte, war Rhodopsin in den kultivierten Zellen nicht mehr zu finden (Publikation II, Abbildung 4). So kamen wir zu dem interessanten Schluss, dass Peripherin 2 sowohl mittels Phagozytose durch RPE-Zellen aufgenommen wird als auch von diesen selbst exprimiert wird. In weiteren Analysen könnte die Expression von Peripherin 2 in RPE-Zellen mittels PCR auf mRNA Ebene weiterhin bestätigt werden. Weitere Erkenntnisse ließen sich aus den Lokalisationsmustern von Peripherin 2 und Rhodopsin in Retina- und RPE-Schnitten von an ERU erkrankten Pferden gewinnen. Peripherin 2, wie auch Rhodopsin, waren in gesunden und auch in uveitischen Retinae unverändert gleichmäßig über die

gesamten äußeren Photorezeptorsegmente verteilt exprimiert (Publikation II, .Abbildung 1). Der Vergleich zwischen gesundem und uveitischem RPE brachte jedoch eine signifikante Reduktion von Peripherin 2 auf 17,9 % in uveitischem RPE hervor, wohingegen für Rhodopsin kein Unterschied zwischen den beiden Konditionen festzustellen war (Publikation II, Abbildung 2 und 3).

Zum einen kann anhand des unveränderten Rhodopsin-Vorkommens in gesundem und uveitischem RPE darauf geschlossen werden, dass die Phagozytose-Aufnahmekapazität in uveitischem, aber dennoch intakten RPE nicht beeinträchtigt ist. Allerdings sind die bisherigen Daten nicht ausreichend, um einen verlangsamten Abbau der Phagosomen in den RPE-Zellen im Falle der ERU ausschließen zu können. Eine solche Dysfunktion der RPE-Zellen, Phagosomen nicht mehr in physiologischer Geschwindigkeit abzubauen zu können, wurde in Zusammenhang mit der Best'schen vitelliformem Makula Dystrophie gebracht (Singh et al. 2013). Mittels der Durchführung von Phagozytoseassays wurde bei dieser retinalen Erkrankung eine verzögerte Abbaufähigkeit der vom RPE phagozytierten äußeren Photorezeptorfragmente festgestellt, was mit dem Pathomechanismus der progressiven und zum Verlust der Sehfähigkeit führenden Erkrankung in Verbindung gebracht wurde (Singh et al. 2013). Um die Phagozytosefähigkeit des RPEs in Zusammenhang mit der ERU genauer zu untersuchen, könnten *in vitro* Phagozytoseassays mit Rhodopsin durchgeführt werden.

Zum anderen zeigt der Vergleich der Peripherin 2-Expression zwischen gesundem und uveitischem RPE interessanterweise, dass die Expressionsänderung von Peripherin 2 im Falle der ERU alleinig das RPE und nicht die Photorezeptoren betrifft. Inwiefern Peripherin 2 an den pathophysiologischen Vorgängen des RPEs im Rahmen der ERU und damit an der Pathogenese des Zusammenbruchs der BRS beteiligt ist, ist noch unklar. Bisher wurde Peripherin 2 auch außerhalb des RPEs noch nicht in Zusammenhang mit der ERU oder anderen Uveitiden gebracht. Interessanterweise sind jedoch heutzutage über 150 Mutationen im Peripherin 2-Gen bekannt (<http://www.retina-international.org/files/sci-news/rdsmut.html>), welche an der Pathogenese mehrerer retinaler Erkrankungen wie Retinitis punctata albescens, Adulte vitelliforme Makuladystrophie, Zapfen-Stäbchen-Degeneration und Retinitis Pigmentosa beteiligt sind (Leroy et al. 2007, Stuck et al. 2014). Je nach Mutation können verschiedene Formen einer Retinadegeneration auftreten. Eine Herunterregulation von Peripherin 2, wie wir sie auch in equinem uveitischem RPE

entdeckt haben, konnte in den äußeren Photorezeptoren bei einem Mausmodell (Nmf193) mit einer Veränderung eines einzelnen Basenpaares im Peripherin 2-Gen nachgewiesen werden (Nystuen et al. 2008). Diese Nmf193-Mäuse zeigten eine progressive Degeneration der Retina mit Defekten in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren (Nystuen et al. 2008). Die verminderte Expression von Peripherin 2 wurde in direkten Zusammenhang mit der Degeneration der Photorezeptoren gebracht, da in einem anderen nicht Peripherin 2-genassoziierten Mausmodell ebenso eine verminderte Peripherin 2-Expression mit einer vergleichbaren Degeneration der Photorezeptoren wie auch im Nmf193-Mausmodell detektiert werden konnte (Nystuen et al. 2008). So wäre es auch denkbar, dass die verminderte Expression von Peripherin 2 in direktem Zusammenhang mit dem Zusammenbruch der BRS steht.

Durch die in dieser Studie erstmals durchgeführte *in situ* Biotinylierung zur Anreicherung von Oberflächenproteinen von gesunden und uveitischen RPE-Zellen und deren anschließender Identifizierung mittels LC-MS/MS, konnten zum einen für das physiologische equine RPE noch nicht beschriebene, funktionell wichtige Proteine detektiert werden. Zum anderen konnten auch mehrere interessante und ebenso zum Teil für das RPE noch unbekannt differenziell exprimierte Proteine in Bezug auf die ERU identifiziert werden. Da es sich dabei zunächst um einen eher deskriptiven Datensatz handelt, müssen nun weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um funktionelle Daten zur Pathogenese des Zusammenbruchs der BRS bei der ERU zu erhalten. Hierfür konnten wir mit unserer neuartigen Methode und der weiteren Charakterisierung unserer vier Kandidatenproteine einen soliden Grundstock schaffen. In anknüpfenden Untersuchungen wird vor allem die Betrachtung des Einflusses der vier Kandidatenproteine Synaptotagmin 1, Basigin, Collectrin und Peripherin 2 auf die Durchlässigkeit der BRS im Fokus stehen. So könnte man durch die Kultivierung von RPE-Zellen, bei welchen zuvor ein Knockout der beschriebenen Kandidatenproteine durchgeführt wurde, auf Transwell-Filtern die BRS *in vitro* simulieren und deren Durchlässigkeit mittels der Detektion von Plasmaproteinen oder T-Lymphozyten auf der apikalen Seite des RPE-Monolayers überprüfen. Diese auf Transwell-Filtern angewachsenen RPE-Monolayer könnten anschließend noch histologisch auf mögliche Defekte der Zell-Zelladhäsionen untersucht werden. Ein weiterer Ansatz, um genauere Informationen über die Beteiligung der Kandidatenproteine an den pathophysiologischen Vorgängen bei der

ERU zu erhalten, welche für den Zusammenbruch der BRS verantwortlich sind, wäre die Überprüfung, inwieweit die Expressionsänderung der Kandidatenproteine Einfluss auf die Tight-Junctions der RPE-Zellen nimmt. Hierfür wäre ein Vergleich von *ex vivo* Transversalschnitten von gesundem und uveitischem RPE mittels immunhistologischer Färbungen mit dem jeweiligen Kandidatenprotein und einem Tight-Junction Marker wie ZO-1 denkbar, um so eventuelle Interaktionen des Proteins mit den Tight-Junctions oder Dysregulationen an den Tight-Junctions durch die Expressionsänderung der Kandidatenproteine festzustellen. Auch die Identifizierung verschiedener Interaktoren der Kandidatenproteine mittels Immunopräzipitationsanalysen könnte weitere Informationen zur Funktion der Kandidaten und ihrer Beteiligung an biologischen Pfaden aufdecken, die funktionell an der Pathogenese des Zusammenbruchs der BRS im Falle der ERU beteiligt sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in dieser Studie durchgeführte *in situ* Biotinylierungsanreicherungs- und Zelloberflächenproteine von gesundem und uveitischem equinem RPE eine sehr erfolgreiche Methode ist, mit der selektiv ein äußerst hoher Anteil an Plasmamembranproteinen mittels der differentiellen Proteomanalyse detektiert werden konnte. Durch diese neuartige, effektive und innovative Methode konnte somit zum einen eine solide Grundlage für weitere funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese der ERU und auch der humanen autoimmunen Uveitis, insbesondere in Hinblick auf die BRS, geschaffen werden. Zum anderen konnte auch eine Vorlage für die Identifizierung von Plasmamembranproteinen so nah wie möglich an ihrem physiologischen oder pathologischen Auftreten *in vivo* bei vielen anderen Zelltypen gegeben werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine sehr häufig auftretende autoimmune Augenerkrankung bei Pferden, welche meist mit dem Verlust der Sehfähigkeit der betroffenen Augen einhergeht. Da die ERU das einzig spontane Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis darstellt, ist die Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen der ERU nicht nur veterinärmedizinisch, sondern auch für die Humanmedizin von großer Bedeutung.

Charakteristisch für die ERU sind der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke (BRS) und die Infiltration von autoaggressiven T-Lymphozyten in das innere Auge mit anschließender Zerstörung retinaler Strukturen. Beim Pferd wird die BRS, aufgrund der weitestgehend avaskulären Retina, hauptsächlich von der äußeren Komponente der BRS gebildet, dem retinalen Pigmentepithel (RPE). Im physiologischen Zustand stellt das RPE durch feste Zell-Zellverbindungen sowohl eine stabile mechanische, als auch durch seine Fähigkeit, mit Mediatoren des Immunsystems kommunizieren und interagieren zu können, eine effektive immunologische Barriere dar. Die im Verlauf der ERU stattfindenden pathophysiologischen Mechanismen, welche für den Zusammenbruch dieser Barriere verantwortlich sind, konnten bislang nicht ausreichend geklärt werden. Vor allem Änderungen im Expressionsmuster des Zelloberflächenproteoms könnten hierbei aufgrund der ständigen Interaktion und Kommunikation der RPE-Zellen mit ihrer Umgebung eine entscheidende Rolle spielen. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, differentiell regulierte Zelloberflächenproteine zwischen gesunden und uveitischen RPE-Zellen zu detektieren, welche maßgeblich an der Pathogenese der ERU beteiligt sein könnten. Um so nah wie möglich die am RPE *in vivo* stattfindenden physiologischen und pathophysiologischen Prozesse widerspiegeln zu können, wurden RPE-Zelloberflächenproteine von gesunden und an ERU erkrankten Pferden in dieser Studie mittels einer neuartigen *in situ* Biotinylierungsmethode angereichert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnten insgesamt 148 Proteine identifiziert werden, von denen 81,8 % Plasmamembranproteine waren, was deutlich für den Erfolg der neuartigen Anreicherungsmethode sprach. Unter den 148 insgesamt identifizierten Proteinen befanden sich 27 differentiell regulierte Proteine, wovon in uveitischem RPE drei hoch- und 24 herunterreguliert waren. Neben den für RPE-Zellen klassischen Proteinen wie RPE65, Rhodopsin und S-Arrestin konnten

auch mehrere Proteine detektiert werden, die unseres Wissens zuvor noch nicht in RPE-Zellen beschrieben wurden, wie der Glukosetransporter 4, Synaptotagmin 1 und Peripherin 2. Funktionell besonders interessant fanden wir die vier Proteine Synaptotagmin 1, Basigin, Collectrin und Peripherin 2, welche alle mit einer verminderten Expression in uveitischem RPE zu finden waren. Interessanterweise ergab sich aus einer Pathway-Analyse für alle vier Proteine eine Beteiligung an „Visual Functions“ und „Immunological Diseases“. Mittels weiterführender Analysen wie der Durchflusszytometrie, der Immunhistologie und der Quantifizierung der Protein-Fluoreszenzintensitäten ist es gelungen die bereits massenspektrometrisch identifizierte verminderte Expression von Synaptotagmin 1, Basigin, Collectrin und Peripherin 2 zu verifizieren und die Proteine näher zu charakterisieren.

Die in dieser Arbeit präsentierte neuartige *in situ* Biotinylierungsmethode zur Anreicherung von Oberflächenproteinen, welche anschließend mittels LC-MS/MS identifiziert wurden, erwies sich als sehr effektive und innovative Methode, um Oberflächenproteine so nah wie möglich in ihrem physiologischen und pathophysiologischen *in vivo* Vorkommen zu untersuchen. Daher liefert der in dieser Arbeit generierte Datensatz der differentiell regulierten Proteine zwischen gesunden und uveitischen RPE-Zellen eine solide Grundlage für weitere funktionelle Analysen zur Aufklärung der Pathogenese der ERU.

7 SUMMARY

Equine recurrent uveitis (ERU) is a highly prevalent autoimmune eye disease in horses, which usually results in blindness of affected eyes. Since ERU is the only spontaneous animal model for human autoimmune uveitis, investigations of underlying pathomechanisms of ERU are not only of high importance for veterinary medicine, but also for human medicine.

Characteristic features of ERU are the breakdown of blood-retinal barrier (BRB) and infiltration of autoaggressive T-lymphocytes into the inner eye with subsequent destruction of retinal structures. The BRB of the horse is, due to its widely avascular retina, formed by the outer component of the BRB, the retinal pigment epithelium (RPE). Based on its strong cell-cell connections, the RPE constitutes a solid mechanical barrier and due to its ability to communicate and interact with mediators of the immune system, an effective immunological barrier under physiological conditions, as well. Pathophysiological mechanisms taking place in course of ERU, which are responsible for the breakdown of BRB, were not sufficiently clarified to date. In this context, especially changes of cell surface proteome could play a decisive role due to the continuous communication and interaction of the RPE cells with their environment. Therefore, the goal of this study was to detect differentially expressed cell surface proteins of healthy and uveitic RPE cells, which might crucially contribute to the pathogenesis of ERU. To reflect physiological and pathophysiological processes taking place at the RPE as close as possible to the *in vivo* situation, cell surface proteins of RPE cells of healthy and ERU diseased horses were captured by a novel *in situ* biotinylation method and afterwards analyzed by mass spectrometry. Thereby, a total of 148 proteins were identified, of which 81.8 % were plasma membrane proteins, representing the success of this novel enrichment method. 27 of 148 totally identified proteins were differentially expressed. Among these, three proteins were upregulated and 24 proteins were downregulated in uveitic RPE. In addition to proteins typically expressed by RPE cells like RPE65, rhodopsin and S-arrestin, several proteins like glucose transporter 4, synaptotagmin 1 and peripherin 2 were detected, which to our knowledge were not described in RPE cells so far. Of high functional interest to us were four proteins, namely synaptotagmin 1, basigin, collectrin and peripherin 2, which were all downregulated in uveitic RPE cells. Interestingly, a pathway analysis showed involvement of all four proteins in

“visual functions” and “immunological diseases”. By performing further analysis such as flow cytometry, immunohistochemistry and quantification of fluorescence intensities, reduced expression of synaptotagmin 1, basigin, collectrin and peripherin 2, which were identified by mass spectrometry, was verified and the proteins were further characterized.

In this study, a novel *in situ* biotinylation method used for cell surface protein enrichment with following identification of these proteins by LC-MS/MS was undertaken. The method proved to be an effective and innovative method to investigate cell surface proteins as closely as possible to their physiological and pathophysiological appearance *in vivo*. Therefore, the data set of differentially regulated proteins of healthy and uveitic RPE cells, which was generated within the present study, sets a great foundation for further functional analysis for clarifying the pathogenesis of ERU.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ablonczy, Z., Dahrouj, M., Tang, P. H., Liu, Y., Sambamurti, K., Marmorstein, A. D. and Crosson, C. E. (2011) Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(12), pp. 8614-20.
- Ablonczy, Z., Prakasam, A., Fant, J., Fauq, A., Crosson, C. and Sambamurti, K. (2009) Pigment epithelium-derived factor maintains retinal pigment epithelium function by inhibiting vascular endothelial growth factor-R2 signaling through gamma-secretase. *J Biol Chem*, 284(44), pp. 30177-86.
- Ach, T., Huisinigh, C., McGwin, G., Jr., Messinger, J. D., Zhang, T., Bentley, M. J., Gutierrez, D. B., Ablonczy, Z., Smith, R. T., Sloan, K. R. and Curcio, C. A. (2014) Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(8), pp. 4832-41.
- Agarwal, R. K., Silver, P. B. and Caspi, R. R. (2012) Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods Mol Biol*, 900, pp. 443-69.
- Ahmado, A., Carr, A. J., Vugler, A. A., Semo, M., Gias, C., Lawrence, J. M., Chen, L. L., Chen, F. K., Turowski, P., da Cruz, L. and Coffey, P. J. (2011) Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(10), pp. 7148-59.
- Alge, C. S., Suppmann, S., Priglinger, S. G., Neubauer, A. S., May, C. A., Hauck, S., Welge-Lussen, U., Ueffing, M. and Kampik, A. (2003) Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(8), pp. 3629-41.
- Almen, M. S., Nordstrom, K. J., Fredriksson, R. and Schioth, H. B. (2009) Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol*, 7(1), pp. 50.
- Amirpour, N., Karamali, F., Razavi, S., Esfandiari, E. and Nasr-Esfahani, M. H. (2014) A proper protocol for isolation of retinal pigment epithelium from rabbit eyes. *Adv Biomed Res*, 3, pp. 4.
- Aoshima, K., Takahashi, K., Ikawa, M., Kimura, T., Fukuda, M., Tanaka, S., Parry, H. E., Fujita, Y., Yoshizawa, A. C., Utsunomiya, S. I., Kajihara, S., Tanaka, K. and Oda, Y. (2014) A simple peak detection and label-free quantitation algorithm for chromatography-mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 15(1), pp. 376.
- Apweiler, R., Aslanidis, C., Deufel, T., Gerstner, A., Hansen, J., Hochstrasser, D., Kellner, R., Kubicek, M., Lottspeich, F., Maser, E., Mewes, H. W., Meyer, H. E., Mullner, S., Mutter, W., Neumaier, M., Nollau, P., Nothwang, H. G., Ponten, F., Radbruch, A., Reinert, K., Rothe, G., Stockinger, H., Tarnok, A., Taussig, M. J., Thiel, A., Thiery, J., Ueffing, M., Valet, G., Vandekerckhove, J., Wagener, C., Wagner, O. and Schmitz, G. (2009) Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry A*, 75(10), pp. 816-32.

- Apweiler, R., Hermjakob, H. and Sharon, N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1473(1), pp. 4-8.
- Arikawa, K., Molday, L. L., Molday, R. S. and Williams, D. S. (1992) Localization of peripherin/rds in the disk membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disk membrane morphogenesis and retinal degeneration. *J Cell Biol*, 116(3), pp. 659-67.
- Arredondo Zamarripa, D., Diaz-Lezama, N., Melendez Garcia, R., Chavez Balderas, J., Adan, N., Ledesma-Colunga, M. G., Arnold, E., Clapp, C. and Thebault, S. (2014) Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front Cell Neurosci*, 8, pp. 333.
- Bamforth, S. D., Lightman, S. and Greenwood, J. (1996) The effect of TNF-alpha and IL-6 on the permeability of the rat blood-retinal barrier in vivo. *Acta Neuropathol*, 91(6), pp. 624-32.
- Ban, Y. and Rizzolo, L. J. (2000) Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res*, 121(1), pp. 89-95.
- Bannai, H., Tsujimura, K., Kondo, T., Nemoto, M., Yamanaka, T., Sugiura, T., Maeda, K. and Matsumura, T. (2011) Induction of a Th-1-biased IgG subclass response against equine herpesvirus type 1 in horses previously infected with type 4 virus. *J Vet Med Sci*, 73(4), pp. 535-39.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. and Kuster, B. (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 389(4), pp. 1017-31.
- Barisani-Asenbauer, T., Maca, S. M., Mejdoubi, L., Emminger, W., Machold, K. and Auer, H. (2012) Uveitis- a rare disease often associated with systemic diseases and infections- a systematic review of 2619 patients. *Orphanet J Rare Dis*, 7, pp. 57.
- Barry, R. J., Nguyen, Q. D., Lee, R. W., Murray, P. I. and Denniston, A. K. (2014) Pharmacotherapy for uveitis: current management and emerging therapy. *Clin Ophthalmol*, 8, pp. 1891-911.
- Bazan, N. G., Rodriguez de Turco, E. B. and Gordon, W. C. (1993) Pathways for the uptake and conservation of docosahexaenoic acid in photoreceptors and synapses: biochemical and autoradiographic studies. *Can J Physiol Pharmacol*, 71(9), pp. 690-98.
- Becerra, S. P., Fariss, R. N., Wu, Y. Q., Montuenga, L. M., Wong, P. and Pfeffer, B. A. (2004) Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Exp Eye Res*, 78(2), pp. 223-34.
- Becirovic, E., Nguyen, O. N., Papparizos, C., Butz, E. S., Stern-Schneider, G., Wolfrum, U., Hauck, S. M., Ueffing, M., Wahl-Schott, C., Michalakakis, S. and Biel, M. (2014)

- Peripherin-2 couples rhodopsin to the CNG channel in outer segments of rod photoreceptors. *Hum Mol Genet*, 23(22), pp. 5989-97.
- Beck, M., Claassen, M. and Aebersold, R. (2011) Comprehensive proteomics. *Curr Opin Biotechnol*, 22(1), pp. 3-8.
- Betts-Obregon, B. S., Gonzalez-Fernandez, F. and Tsin, A. T. (2014) Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) promotes retinol uptake and release by rat Muller cells (rMC-1) in vitro: implications for the cone visual cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(10), pp. 6265-71.
- Blanke, A., Aupperle, H., Seeger, J., Kubick, C. and Schusser, G. F. (2014) Histological Study of the External, Middle and Inner Ear of Horses. *Anat Histol Embryol*, 10.1111/ahe.12151.
- Boesze-Battaglia, K., Song, H., Sokolov, M., Lillo, C., Pankoski-Walker, L., Gretzula, C., Gallagher, B., Rachel, R. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Morris, F., Jacob, J., Yeagle, P., Williams, D. S. and Damek-Poprawa, M. (2007) The tetraspanin protein peripherin-2 forms a complex with melanoregulin, a putative membrane fusion regulator. *Biochemistry*, 46(5), pp. 1256-72.
- Bora, N. S., Matta, B., Lyzogubov, V. V. and Bora, P. S. (2015) Relationship between the complement system, risk factors and prediction models in age-related macular degeneration. *Mol Immunol*, 63(2), pp. 176-83.
- Braun, D. (1995) Die Geschichte der Erforschung und Behandlung der „Periodischen Augenentzündung“ des Pferdes im deutschsprachigen Raum von 1750-1950. *Pferdeheilkunde*, 1, pp. 43-49.
- Burke, J. M. (2008) Epithelial phenotype and the RPE: is the answer blowing in the Wnt? *Prog Retin Eye Res*, 27(6), pp. 579-95.
- Butler, G. S., Dean, R. A., Morrison, C. J. and Overall, C. M. (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, pp. 451-70.
- Caspi, R. R. (2003) Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol*, 10.1002/0471142735.im1506s53.
- Caspi, R. R. (2010) A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest*, 120(9), pp. 3073-83.
- Caspi, R. R. (2014) Understanding autoimmunity in the eye: from animal models to novel therapies. *Discov Med*, 17(93), pp. 155-62.
- Cechova, S., Zeng, Q., Billaud, M., Mutchler, S., Rudy, C. K., Straub, A. C., Chi, L., Chan, F. R., Hu, J., Griffiths, R., Howell, N. L., Madsen, K., Jensen, B. L., Palmer, L. A., Carey, R. M., Sung, S. S., Malakauskas, S. M., Isakson, B. E. and Le, T. H. (2013) Loss of collectrin, an angiotensin-converting enzyme 2 homolog, uncouples

- endothelial nitric oxide synthase and causes hypertension and vascular dysfunction. *Circulation*, 128(16), pp. 1770-80.
- Chen, G. and Pramanik, B. N. (2008) LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends. *Expert Rev Proteomics*, 5(3), pp. 435-44.
- Chen, S., Yan, H., Sun, B., Zuo, A. and Liang, D. (2013) Subretinal transfection of chitosan-loaded TLR3-siRNA for the treatment of experimental autoimmune uveitis. *Eur J Pharm Biopharm*, 85(3 Pt A), pp. 726-35.
- Chen, S., Zhou, S., Zang, K., Kong, F., Liang, D. and Yan, H. (2014) CD73 expression in RPE cells is associated with the suppression of conventional CD4 cell proliferation. *Exp Eye Res*, 127, pp. 26-36.
- Chen, Y., Yang, P., Li, F. and Kijlstra, A. (2011) The effects of Th17 cytokines on the inflammatory mediator production and barrier function of ARPE-19 cells. *PLoS One*, 6(3), pp. e18139.
- Chen, Y. T., Chen, C. L., Chen, H. W., Chung, T., Wu, C. C., Chen, C. D., Hsu, C. W., Chen, M. C., Tsui, K. H., Chang, P. L., Chang, Y. S. and Yu, J. S. (2010) Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology. *J Proteome Res*, 9(11), pp. 5803-15.
- Chu, P. L. and Le, T. H. (2014) Role of collectrin, an ACE2 homologue, in blood pressure homeostasis. *Curr Hypertens Rep*, 16(11), pp. 490.
- Collier, R. J., Wang, Y., Smith, S. S., Martin, E., Ornberg, R., Rhoades, K. and Romano, C. (2011) Complement deposition and microglial activation in the outer retina in light-induced retinopathy: inhibition by a 5-HT_{1A} agonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(11), pp. 8108-16.
- Conley, S. M. and Naash, M. I. (2014) Gene therapy for PRPH2-associated ocular disease: challenges and prospects. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(11), pp. a017376.
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F. and Annunziato, F. (2014) T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*, 85(1), pp. 36-42.
- Daudin, J. B., Monnet, D., Kaviani, N., Espy, C., Wang, A., Chereau, C., Goulvestre, C., Omri, S., Brezin, A., Weill, B., Batteux, F. and Nicco, C. (2011) Protective effect of pristane on experimental autoimmune uveitis. *Immunol Lett*, 141(1), pp. 83-93.
- Deeg, C. A., Altmann, F., Hauck, S. M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M. and Ueffing, M. (2007a) Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics*, 7(9), pp. 1540-48.
- Deeg, C. A., Amann, B., Raith, A. J. and Kaspers, B. (2006a) Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(2), pp. 652-56.

- Deeg, C. A., Ehrenhofer, M., Thurau, S. R., Reese, S., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002a) Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res*, 75(2), pp. 127-33.
- Deeg, C. A., Hauck, S. M., Amann, B., Pompetzki, D., Altmann, F., Raith, A., Schmalzl, T., Stangassinger, M. and Ueffing, M. (2008) Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res*, 40(3-4), pp. 151-53.
- Deeg, C. A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thurau, S. R., Wollanke, B. and Wildner, G. (2001) Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(2), pp. 393-98.
- Deeg, C. A., Pompetzki, D., Raith, A. J., Hauck, S. M., Amann, B., Suppmann, S., Goebel, T. W., Olazabal, U., Gerhards, H., Reese, S., Stangassinger, M., Kaspers, B. and Ueffing, M. (2006b) Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics*, 5(8), pp. 1462-70.
- Deeg, C. A., Raith, A. J., Amann, B., Crabb, J. W., Thurau, S. R., Hauck, S. M., Ueffing, M., Wildner, G. and Stangassinger, M. (2007b) CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol*, 2007, pp. 39245.
- Deeg, C. A., Reese, S., Gerhards, H., Wildner, G. and Kaspers, B. (2004) The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7), pp. 2286-92.
- Deeg, C. A., Thurau, S. R., Gerhards, H., Ehrenhofer, M., Wildner, G. and Kaspers, B. (2002b) Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol*, 32(9), pp. 2598-606.
- Degroote, R. L., Hauck, S. M., Amann, B., Hirmer, S., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2014) Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis. *PLoS One*, 9(3), pp. e91684.
- Degroote, R. L., Hauck, S. M., Treutlein, G., Amann, B., Frohlich, K. J., Kremmer, E., Merl, J., Stangassinger, M., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2013) Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 12(12), pp. 5812-19.
- Del Prete, D., Lombino, F., Liu, X. and D'Adamio, L. (2014) APP is cleaved by Bace1 in pre-synaptic vesicles and establishes a pre-synaptic interactome, via its intracellular domain, with molecular complexes that regulate pre-synaptic vesicles functions. *PLoS One*, 9(9), pp. e108576.
- Deora, A. A., Philp, N., Hu, J., Bok, D. and Rodriguez-Boulan, E. (2005) Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(45), pp. 16245-50.
- Dithmer, M., Fuchs, S., Shi, Y., Schmidt, H., Richert, E., Roider, J. and Klettner, A. (2014) Fucoidan reduces secretion and expression of vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium and reduces angiogenesis in vitro. *PLoS One*, 9(2), pp. e89150.

- Dongre, A. R., Eng, J. K. and Yates, J. R., 3rd (1997) Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *Trends Biotechnol*, 15(10), pp. 418-25.
- Edelmann, M. L., McMullen, R., Jr., Stoppini, R., Clode, A. and Gilger, B. C. (2014) Retrospective evaluation of phacoemulsification and aspiration in 41 horses (46 eyes): visual outcomes vs. age, intraocular lens, and uveitis status. *Vet Ophthalmol*, 17 (Suppl 1), pp. 160-67.
- Eisenfeld, A. J., Bunt-Milam, A. H. and Saari, J. C. (1987) Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Exp Eye Res*, 44(3), pp. 425-38.
- El-Beltagy, A. E. (2014) Light and electron microscopic studies on the pigmented epithelium and photoreceptors of the retina of common buzzard (*Buteo buteo*). *Tissue Cell*, 47(1), pp. 78–85
- Elschenbroich, S., Kim, Y., Medin, J. A. and Kislinger, T. (2010) Isolation of cell surface proteins for mass spectrometry-based proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 7(1), pp. 141-54.
- Fajt, M. L. and Wenzel, S. E. (2014) Biologic therapy in asthma: entering the new age of personalized medicine. *J Asthma*, 51(7), pp. 669-76.
- Farnoodian, M., Kinter, J. B., Yadranji Aghdam, S., Zaitoun, I., Sorenson, C. M. and Sheibani, N. (2015) Expression of pigment epithelium-derived factor and thrombospondin-1 regulate proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells. *Physiol Rep*, 3(1), pp. e12266.
- Fatima, R., Jha, R., Gowrishankar, S., Narayen, G. and Rao, B. S. (2014) Proliferative glomerulonephritis associated with monoclonal immune deposits: A case report and review of literature. *Indian J Nephrol*, 24(6), pp. 376-79.
- Ferris, F. L., 3rd, Wilkinson, C. P., Bird, A., Chakravarthy, U., Chew, E., Csaky, K., Sadda, S. R. and Beckman Initiative for Macular Research Classification, C. (2013) Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 120(4), pp. 844-51.
- Ford, K. M., Saint-Geniez, M., Walshe, T., Zahr, A. and D'Amore, P. A. (2011) Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(13), pp. 9478-87.
- Gallagher-Colombo, S., Maminishkis, A., Tate, S., Grunwald, G. B. and Philp, N. J. (2010) Modulation of MCT3 expression during wound healing of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(10), pp. 5343-50.
- Galvin, J. A., Fishman, G. A., Stone, E. M. and Koenekoop, R. K. (2005) Clinical phenotypes in carriers of Leber congenital amaurosis mutations. *Ophthalmology*, 112(2), pp. 349-56.

- Gasparin, F., Takahashi, B. S., Scolari, M. R., Gasparin, F., Pedral, L. S. and Damico, F. M. (2012) Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. *Arq Bras Oftalmol*, 75(2), pp. 143-7.
- Gilger, B. C. (2010) Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA. *Equine Vet J Suppl*, (37), pp. 57-61.
- Gilger, B. C., Malok, E., Cutter, K. V., Stewart, T., Horohov, D. W. and Allen, J. B. (1999) Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 71(1), pp. 17-28.
- Gilger, B. C. and Michau, T. M. (2004) Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20(2), pp. 417-27, vii.
- Gilger, B. C., Wilkie, D. A., Clode, A. B., McMullen, R. J., Jr., Utter, M. E., Komaromy, A. M., Brooks, D. E. and Salmon, J. H. (2010) Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*, 13(5), pp. 294-300.
- Glavan, G., Schliebs, R. and Zivin, M. (2009) Synaptotagmins in neurodegeneration. *Anat Rec (Hoboken)*, 292(12), pp. 1849-62.
- Goodman, L. B., Wagner, B., Flaminio, M. J., Sussman, K. H., Metzger, S. M., Holland, R. and Osterrieder, N. (2006) Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine*, 24(17), pp. 3636-45.
- Govers, R. (2014) Cellular regulation of glucose uptake by glucose transporter GLUT4. *Adv Clin Chem*, 66, pp. 173-240.
- Grass, G. D., Dai, L., Qin, Z., Parsons, C. and Toole, B. P. (2014) CD147: regulator of hyaluronan signaling in invasiveness and chemoresistance. *Adv Cancer Res*, 123, pp. 351-73.
- Gregerson, D. S., Heuss, N. D., Lew, K. L., McPherson, S. W. and Ferrington, D. A. (2007) Interaction of retinal pigmented epithelial cells and CD4 T cells leads to T-cell anergy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(10), pp. 4654-63.
- Gu, X., Neric, N. J., Crabb, J. S., Crabb, J. W., Bhattacharya, S. K., Rayborn, M. E., Hollyfield, J. G. and Bonilha, V. L. (2012) Age-related changes in the retinal pigment epithelium (RPE). *PLoS One*, 7(6), pp. e38673.
- Guo, D., Gu, P., Liu, Z., Tang, K., Du, Y. and Bi, H. (2015) Proteomic analysis of rat plasma with experimental autoimmune uveitis based on label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 976-977, pp. 84-90.
- Guymer, R., Luthert, P. and Bird, A. (1999) Changes in Bruch's membrane and related structures with age. *Prog Retin Eye Res*, 18(1), pp. 59-90.

- Ham, D. I., Gentleman, S., Chan, C. C., McDowell, J. H., Redmond, T. M. and Gery, I. (2002) RPE65 is highly uveitogenic in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(7), pp. 2258-63.
- Hamann, S., Kiilgaard, J. F., la Cour, M., Prause, J. U. and Zeuthen, T. (2003) Cotransport of H⁺, lactate, and H₂O in porcine retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 76(4), pp. 493-504.
- Hamann, S., la Cour, M., Lui, G. M., Bundgaard, M. and Zeuthen, T. (2000) Transport of protons and lactate in cultured human fetal retinal pigment epithelial cells. *Pflugers Arch*, 440(1), pp. 84-92.
- Hauck, S. M., Dietter, J., Kramer, R. L., Hofmaier, F., Zipplies, J. K., Amann, B., Feuchtinger, A., Deeg, C. A. and Ueffing, M. (2010) Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 9(10), pp. 2292-305.
- Hauck, S. M., Hofmaier, F., Dietter, J., Swadzba, M. E., Blindert, M., Amann, B., Behler, J., Kremmer, E., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2012) Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics*, 75(14), pp. 4545-54.
- Hauck, S. M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M., Gerhards, H., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2007) Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 6(6), pp. 2121-31.
- Haurigot, V., Villacampa, P., Ribera, A., Bosch, A., Ramos, D., Ruberte, J. and Bosch, F. (2012) Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy. *PLoS One*, 7(7), pp. e41511.
- Hines, M. T. (1984) Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet Clin North Am Large Anim Pract*, 6(3), pp. 501-12.
- Hollborn, M., Dukic-Stefanovic, S., Pannicke, T., Ulbricht, E., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Bringmann, A. and Kohen, L. (2011) Expression of aquaporins in the retina of diabetic rats. *Curr Eye Res*, 36(9), pp. 850-6.
- Holley, R. J., Tai, G., Williamson, A. J., Taylor, S., Cain, S. A., Richardson, S. M., Merry, C. L., Whetton, A. D., Kielty, C. M. and Canfield, A. E. (2015) Comparative Quantification of the Surfaceome of Human Multipotent Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cell Reports*, 10.1016/j.stemcr.2015.01.007.
- Hooper-McGrevy, K. E., Wilkie, B. N. and Prescott, J. F. (2003) Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10(3), pp. 345-51.
- Horai, R., Silver, P. B., Chen, J., Agarwal, R. K., Chong, W. P., Jittayasothorn, Y., Mattapallil, M. J., Nguyen, S., Natarajan, K., Villasmil, R., Wang, P., Karabekian, Z., Lytton, S. D., Chan, C. C. and Caspi, R. R. (2013) Breakdown of immune privilege

- and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen. *J Autoimmun*, 44, pp. 21-33.
- Hori, K., Katayama, N., Kachi, S., Kondo, M., Kadomatsu, K., Usukura, J., Muramatsu, T., Mori, S. and Miyake, Y. (2000) Retinal dysfunction in basigin deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(10), pp. 3128-33.
- Houssier, M., Raoul, W., Lavalette, S., Keller, N., Guillonneau, X., Baragatti, B., Jonet, L., Jeanny, J. C., Behar-Cohen, F., Coceani, F., Scherman, D., Lachapelle, P., Ong, H., Chemtob, S. and Sennlaub, F. (2008) CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med*, 5(2), pp. e39.
- Hu, J. G., Gallemore, R. P., Bok, D. and Frambach, D. A. (1996) Chloride transport in cultured fetal human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*, 62(4), pp. 443-8.
- Johnson, A. A., Lee, Y. S., Stanton, J. B., Yu, K., Hartzell, C. H., Marmorstein, L. Y. and Marmorstein, A. D. (2013) Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. *Hum Mol Genet*, 22(23), pp. 4688-97.
- Juel, H. B., Faber, C., Svendsen, S. G., Vallejo, A. N. and Nissen, M. H. (2013) Inflammatory cytokines protect retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death. *PLoS One*, 8(5), pp. e64619.
- Juel, H. B., Faber, C., Udsen, M. S., Folkersen, L. and Nissen, M. H. (2012) Chemokine expression in retinal pigment epithelial ARPE-19 cells in response to coculture with activated T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(13), pp. 8472-80.
- Juel, H. B., Kaestel, C., Folkersen, L., Faber, C., Heegaard, N. H., Borup, R. and Nissen, M. H. (2011) Retinal pigment epithelial cells upregulate expression of complement factors after co-culture with activated T cells. *Exp Eye Res*, 92(3), pp. 180-8.
- Kaczara, P., Zareba, M., Herrnreiter, A., Skumatz, C. M., Zadlo, A., Sarna, T. and Burke, J. M. (2012) Melanosome-iron interactions within retinal pigment epithelium-derived cells. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25(6), pp. 804-14.
- Kaji, H., Yamauchi, Y., Takahashi, N. and Isobe, T. (2006) Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. *Nat Protoc*, 1(6), pp. 3019-27.
- Kalsow, C. M. and Dwyer, A. E. (1998) Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*, 6(4), pp. 239-51.
- Kanan, Y., Gordon, W. C., Mukherjee, P. K., Bazan, N. G. and Al-Ubaidi, M. R. (2014) Neuroprotectin D1 is Synthesized in the Cone Photoreceptor Cell Line 661W and Elicits Protection Against Light-Induced Stress. *Cell Mol Neurobiol*, 10.1007/s10571-014-0111-4.
- Kaushik, D. K., Hahn, J. N. and Yong, V. W. (2015) EMMPRIN, an upstream regulator of MMPs, in CNS biology. *Matrix Biol*, 10.1016/j.matbio.2015.01.018.

- Kelley, R. A., Al-Ubaidi, M. R. and Naash, M. I. (2014) Retbindin is an Extracellular Riboflavin Binding Protein Found at the Photoreceptor/Retinal Pigment Epithelium Interface. *J Biol Chem*, 10.1074/jbc.M114.624189.
- Kim, J. H., Kim, J. H., Lee, Y. M., Ahn, E. M., Kim, K. W. and Yu, Y. S. (2009) Decursin inhibits VEGF-mediated inner blood-retinal barrier breakdown by suppression of VEGFR-2 activation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(9), pp. 1559-67.
- Kim, Y., Elschenbroich, S., Sharma, P., Sepiashvili, L., Gramolini, A. O. and Kislinger, T. (2011) Use of colloidal silica-beads for the isolation of cell-surface proteins for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol*, 748, pp. 227-41.
- Kurien, B. T., Dorri, Y., Bachmann, M. and Scofield, R. H. (2012) Induction of anti-Ro60/anti-La by immunisation with spectrin and induction of anti-spectrin by immunisation with Ro60 and 4-hydroxy-2-nonenal-modified Ro60 immunisation. *Clin Exp Rheumatol*, 30(6), pp. 886-93.
- Lange, S., Sylvester, M., Schumann, M., Freund, C. and Krause, E. (2010) Identification of phosphorylation-dependent interaction partners of the adapter protein ADAP using quantitative mass spectrometry: SILAC vs (18)O-labeling. *J Proteome Res*, 9(8), pp. 4113-22.
- LaVail, M. M. (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science*, 194(4269), pp. 1071-4.
- Lee, R. W., Nicholson, L. B., Sen, H. N., Chan, C. C., Wei, L., Nussenblatt, R. B. and Dick, A. D. (2014) Autoimmune and autoinflammatory mechanisms in uveitis. *Semin Immunopathol*, 36(5), pp. 581-94.
- Leffler, J., Bengtsson, A. A. and Blom, A. M. (2014) The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis*, 73(9), pp. 1601-6.
- Leroy, B. P., Kailasanathan, A., De Laey, J. J., Black, G. C. and Manson, F. D. (2007) Intrafamilial phenotypic variability in families with RDS mutations: exclusion of ROM1 as a genetic modifier for those with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol*, 91(1), pp. 89-93.
- Li, N., Aoki, V., Hans-Filho, G., Rivitti, E. A. and Diaz, L. A. (2003) The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med*, 197(11), pp. 1501-10.
- Li, R., Wen, R., Banzon, T., Maminishkis, A. and Miller, S. S. (2011) CNTF mediates neurotrophic factor secretion and fluid absorption in human retinal pigment epithelium. *PLoS One*, 6(9), pp. e23148.
- Li, S., Nguyen, T. T. and Bonanno, J. A. (2014) CD147 required for corneal endothelial lactate transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(7), pp. 4673-81.
- Liegl, R., Koenig, S., Siedlecki, J., Haritoglou, C., Kampik, A. and Kernt, M. (2014) Temsirolimus inhibits proliferation and migration in retinal pigment epithelial and

- endothelial cells via mTOR inhibition and decreases VEGF and PDGF expression. *PLoS One*, 9(2), pp. e88203.
- Lin, C. C., Seikowski, J., Perez-Lara, A., Jahn, R., Hobartner, C. and Walla, P. J. (2014) Control of membrane gaps by synaptotagmin-Ca²⁺ measured with a novel membrane distance ruler. *Nat Commun*, 5, pp. 5859.
- Lin, H. and Miller, S. S. (1991) pHi regulation in frog retinal pigment epithelium: two apical membrane mechanisms. *Am J Physiol*, 261(1 Pt 1), pp. C132-42.
- Lin, H. and Miller, S. S. (1994) pHi-dependent Cl-HCO₃ exchange at the basolateral membrane of frog retinal pigment epithelium. *Am J Physiol*, 266(4 Pt 1), pp. C935-45.
- Liu, R. T., Gao, J., Cao, S., Sandhu, N., Cui, J. Z., Chou, C. L., Fang, E. and Matsubara, J. A. (2013) Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE in vivo: implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(3), pp. 2225-37.
- Liu, X., Liu, L., Li, H., Xu, F., Jiang, R. and Sui, R. (2015) Rdh5 retinopathy (fundus albipunctatus) with preserved rod function. *Retina*, 35(3), pp. 582-89.
- Liversidge, J., Grabowski, P., Ralston, S., Benjamin, N. and Forrester, J. V. (1994) Rat retinal pigment epithelial cells express an inducible form of nitric oxide synthase and produce nitric oxide in response to inflammatory cytokines and activated T cells. *Immunology*, 83(3), pp. 404-9.
- Liversidge, J., McKay, D., Mullen, G. and Forrester, J. V. (1993) Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retina barrier by autocrine PGE₂ and membrane-bound mechanisms. *Cell Immunol*, 149(2), pp. 315-30.
- Lorenz, B., Gyurus, P., Preising, M., Bremser, D., Gu, S., Andrassi, M., Gerth, C. and Gal, A. (2000) Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(9), pp. 2735-42.
- Loukovaara, S., Lehti, K., Robciuc, A., Pessi, T., Holopainen, J. M., Koli, K., Immonen, I. and Keski-Oja, J. (2014) Increased intravitreal angiopoietin-2 levels associated with rhegmatogenous retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 252(6), pp. 881-8.
- Luger, D., Silver, P. B., Tang, J., Cua, D., Chen, Z., Iwakura, Y., Bowman, E. P., Sgambellone, N. M., Chan, C. C. and Caspi, R. R. (2008) Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med*, 205(4), pp. 799-810.
- Luna, J. D., Chan, C. C., Derevjaniuk, N. L., Mahlow, J., Chiu, C., Peng, B., Tobe, T., Campochiaro, P. A. and Vinore, S. A. (1997) Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res*, 49(3), pp. 268-80.

- Maminishkis, A., Jalickee, S., Blaug, S. A., Rymer, J., Yerxa, B. R., Peterson, W. M. and Miller, S. S. (2002) The P2Y(2) receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(11), pp. 3555-66.
- Mann, M. (2006) Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12), pp. 952-8.
- Marmorstein, A. D. (2001) The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic*, 2(12), pp. 867-72.
- Marmorstein, A. D., Gan, Y. C., Bonilha, V. L., Finnemann, S. C., Csaky, K. G. and Rodriguez-Boulan, E. (1998) Apical polarity of N-CAM and EMMPRIN in retinal pigment epithelium resulting from suppression of basolateral signal recognition. *J Cell Biol*, 142(3), pp. 697-710.
- Mathern, D. R. and Heeger, P. S. (2015) Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10.2215/CJN.06230614.
- Mazzoni, F., Safa, H. and Finnemann, S. C. (2014) Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Exp Eye Res*, 126, pp. 51-60.
- McKay, B. S., Irving, P. E., Skumatz, C. M. and Burke, J. M. (1997) Cell-cell adhesion molecules and the development of an epithelial phenotype in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 65(5), pp. 661-71.
- Medawar, P. B. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*, 29(1), pp. 58-69.
- Miceli, M. V., Liles, M. R. and Newsome, D. A. (1994) Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res*, 214(1), pp. 242-9.
- Miller, S. S. and Steinberg, R. H. (1977) Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol*, 36(4), pp. 337-72.
- Milyushina, L. A., Verdiev, B. I., Kuznetsova, A. V. and Aleksandrova, M. A. (2012) Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human in vitro. *Bull Exp Biol Med*, 153(1), pp. 157-62.
- Miura, Y., Klettner, A. and Roeder, J. (2010) VEGF antagonists decrease barrier function of retinal pigment epithelium in vitro: possible participation of intracellular glutathione. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(9), pp. 4848-55.
- Mochizuki, M., Kuwabara, T., McAllister, C., Nussenblatt, R. B. and Gery, I. (1985) Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26(1), pp. 1-9.

- Moses, S., Jambulingam, M. and Madhavan, H. N. (2014) A pilot study on expression of toll like receptors (TLRs) in response to herpes simplex virus (HSV) infection in acute retinal pigment epithelial cells (ARPE) cells. *J Postgrad Med*, 60(3), pp. 243-7.
- Mufson, E. J., Counts, S. E. and Ginsberg, S. D. (2002) Gene expression profiles of cholinergic nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 27(10), pp. 1035-48.
- Muniz, A., Greene, W. A., Plamper, M. L., Choi, J. H., Johnson, A. J., Tsin, A. T. and Wang, H. C. (2014) Retinoid uptake, processing, and secretion in human iPS-RPE support the visual cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(1), pp. 198-209.
- Na, S. Y., Park, M. J., Park, S. and Lee, E. S. (2013) Up-regulation of Th17 and related cytokines in Behcet's disease corresponding to disease activity. *Clin Exp Rheumatol*, 31(3 Suppl 77), pp. 32-40.
- Nandrot, E. F., Silva, K. E., Scelfo, C. and Finnemann, S. C. (2012) Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of alpha5beta1 integrin. *Biol Cell*, 104(6), pp. 326-41.
- Narimatsu, T., Ozawa, Y., Miyake, S., Kubota, S., Hirasawa, M., Nagai, N., Shimmura, S. and Tsubota, K. (2013) Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(7), pp. 4555-62.
- Niederhorn, J. Y. (2012) Ocular immune privilege and ocular melanoma: parallel universes or immunological plagiarism? *Front Immunol*, 3, pp. 148.
- Niederhorn, J. Y. and Stein-Streilein, J. (2010) History and physiology of immune privilege. *Ocul Immunol Inflamm*, 18(1), pp. 19-23.
- Nishibaba, R., Higashi, Y., Su, J., Furukawa, T., Kawai, K. and Kanekura, T. (2012) CD147-targeting siRNA inhibits cell-matrix adhesion of human malignant melanoma cells by phosphorylating focal adhesion kinase. *J Dermatol*, 39(1), pp. 63-7.
- Niu, N., Zhang, J., Guo, Y., Zhao, Y., Korteweg, C. and Gu, J. (2011) Expression and distribution of immunoglobulin G and its receptors in the human nervous system. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(4), pp. 556-63.
- Niu, N., Zhang, J. and McNutt, M. A. (2013) Endogenous IgG affects the cell biology of RPE cells and involves the TLR4 pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(10), pp. 7045-52.
- Nossoni, Z., Assar, Z., Yapici, I., Nosrati, M., Wang, W., Berbasova, T., Vasileiou, C., Borhan, B. and Geiger, J. (2014) Structures of holo wild-type human cellular retinol-binding protein II (hCRBPII) bound to retinol and retinal. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70(Pt 12), pp. 3226-32.
- Nussenblatt, R. B., Kuwabara, T., de Monasterio, F. M. and Wacker, W. B. (1981) S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol*, 99(6), pp. 1090-2.

- Nystuen, A. M., Sachs, A. J., Yuan, Y., Heuermann, L. and Haider, N. B. (2008) A novel mutation in Prph2, a gene regulated by Nr2e3, causes retinal degeneration and outer-segment defects similar to Nr2e3 (rd7/rd7) retinas. *Mamm Genome*, 19(9), pp. 623-33.
- O'Day, W. T. and Young, R. W. (1978) Rhythmic daily shedding of outer-segment membranes by visual cells in the goldfish. *J Cell Biol*, 76(3), pp. 593-604.
- Ogata, N., Wada, M., Otsuji, T., Jo, N., Tombran-Tink, J. and Matsumura, M. (2002) Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(4), pp. 1168-75.
- Okoye, I. S., Czieso, S., Ktistaki, E., Roderick, K., Coomes, S. M., Pelly, V. S., Kannan, Y., Perez-Lloret, J., Zhao, J. L., Baltimore, D., Langhorne, J. and Wilson, M. S. (2014) Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(30), pp. E3081-90.
- Osada, M., Sakai, T., Kuroyanagi, K., Kohno, H. and Tsuneoka, H. (2014) Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate. *Mol Vis*, 20, pp. 1518-26.
- Ostwald, T. J. and Steinberg, R. H. (1980) Localization of frog retinal pigment epithelium Na⁺-K⁺ ATPase. *Exp Eye Res*, 31(3), pp. 351-60.
- Osusky, R., Dorio, R. J., Arora, Y. K., Ryan, S. J. and Walker, S. M. (1997) MHC class II positive retinal pigment epithelial (RPE) cells can function as antigen-presenting cells for microbial superantigen. *Ocul Immunol Inflamm*, 5(1), pp. 43-50.
- Ozaki, T., Nakazawa, M., Kudo, T., Hirano, S., Suzuki, K. and Ishiguro, S. (2014) Protection of cone photoreceptor M-opsin degradation with 9-cis-beta-carotene-rich alga *Dunaliella bardawil* in Rpe65(-/-) mouse retinal explant culture. *Curr Eye Res*, 39(12), pp. 1221-31.
- Pablo, K. A. and Ochriotor, J. D. (2013) Deletion of the Basigin gene results in reduced mitochondria in the neural retina. *Biochem Biophys Res Commun*, 438(3), pp. 546-50.
- Park, S. W., Kim, J. H., Mook-Jung, I., Kim, K. W., Park, W. J., Park, K. H. and Kim, J. H. (2014) Intracellular amyloid beta alters the tight junction of retinal pigment epithelium in 5XFAD mice. *Neurobiol Aging*, 35(9), pp. 2013-20.
- Parker, R. O. and Crouch, R. K. (2010) Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp Eye Res*, 91(6), pp. 788-92.
- Parver, L. M. (1991) Temperature modulating action of choroidal blood flow. *Eye (Lond)*, 5 (Pt 2), pp. 181-5.
- Patel, V. J., Thalassinou, K., Slade, S. E., Connolly, J. B., Crombie, A., Murrell, J. C. and Scrivens, J. H. (2009) A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *J Proteome Res*, 8(7), pp. 3752-9.

-
- Paul, D., Kumar, A., Gajbhiye, A., Santra, M. K. and Srikanth, R. (2013) Mass spectrometry-based proteomics in molecular diagnostics: discovery of cancer biomarkers using tissue culture. *Biomed Res Int*, 2013, pp. 783131.
- Pennings, G. J. and Kritharides, L. (2014) CD147 in cardiovascular disease and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 40(7), pp. 747-55.
- Pepaj, M., Gjerlaugsen, N., Julien, K. and Thorsby, P. M. (2014) Tmem27 is upregulated by vitamin D in INS-1 cells and its serum concentrations are low in patients with autoimmune diabetes. *Scand J Clin Lab Invest*, 10.3109/00365513.2014.898322.
- Phenekos, C., Vryonidou, A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., Goula, M. and Papamichail, M. (2004) Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*, 11(4), pp. 209-13.
- Philp, N. J., Ochriotor, J. D., Rudoy, C., Muramatsu, T. and Linser, P. J. (2003a) Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(3), pp. 1305-11.
- Philp, N. J., Wang, D., Yoon, H. and Hjelmeland, L. M. (2003b) Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(4), pp. 1716-21.
- Picard, E., Houssier, M., Bujold, K., Sapielha, P., Lubell, W., Dorfman, A., Racine, J., Hardy, P., Febbraio, M., Lachapelle, P., Ong, H., Sennlaub, F. and Chemtob, S. (2010) CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging (Albany NY)*, 2(12), pp. 981-9.
- Priglinger, C. S., Szober, C. M., Priglinger, S. G., Merl, J., Euler, K. N., Kernt, M., Gondi, G., Behler, J., Geerlof, A., Kampik, A., Ueffing, M. and Hauck, S. M. (2013) Galectin-3 induces clustering of CD147 and integrin-beta1 transmembrane glycoprotein receptors on the RPE cell surface. *PLoS One*, 8(7), pp. e70011.
- Qiao, Y., Hu, R., Wang, Q., Qi, J., Yang, Y., Kijlstra, A. and Yang, P. (2012) Sphingosine 1-phosphate elicits proinflammatory responses in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(13), pp. 8200-7.
- Qin, S. and Rodrigues, G. A. (2008) Progress and perspectives on the role of RPE cell inflammatory responses in the development of age-related macular degeneration. *J Inflamm Res*, 1, pp. 49-65.
- Ramaglia, V., Jackson, S. J., Hughes, T. R., Neal, J. W., Baker, D. and Morgan, B. P. (2015) Complement activation and expression during chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the Biozzi ABH mouse. *Clin Exp Immunol*, 10.1111/cei.12595.
- Rebhun, W. C. (1979) Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J Am Vet Med Assoc*, 175(8), pp. 803-8.

- Reddy, P. H., Mani, G., Park, B. S., Jacques, J., Murdoch, G., Whetsell, W., Jr., Kaye, J. and Manczak, M. (2005) Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis*, 7(2), pp. 103-117; discussion 73-80.
- Regan, D. P., Aarnio, M. C., Davis, W. S., Carmichael, K. P., Vandenplas, M. L., Lauderdale, J. D. and Moore, P. A. (2012) Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*, 15(3), pp. 145-52.
- Reynolds, R., Hartnett, M. E., Atkinson, J. P., Giclas, P. C., Rosner, B. and Seddon, J. M. (2009) Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(12), pp. 5818-27.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. and Lambris, J. D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11(9), pp. 785-97.
- Ripamonti, C., Henning, G. B., Ali, R. R., Bainbridge, J. W., Robbie, S. J., Sundaram, V., Luong, V. A., van den Born, L. I., Casteels, I., de Ravel, T. J., Moore, A. T. and Stockman, A. (2014) Nature of the visual loss in observers with Leber's congenital amaurosis caused by specific mutations in RPE65. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(10), pp. 6817-28.
- Romeike, A., Brugmann, M. and Drommer, W. (1998) Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol*, 35(6), pp. 515-26.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A. and Pappin, D. J. (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*, 3(12), pp. 1154-69.
- Sanchez-Chavez, G., Pena-Rangel, M. T., Riesgo-Escovar, J. R., Martinez-Martinez, A. and Salceda, R. (2012) Insulin stimulated-glucose transporter Glut 4 is expressed in the retina. *PLoS One*, 7(12), pp. e52959.
- Sandahl, T. D., Kelsen, J., Dige, A., Dahlerup, J. F., Agnholt, J., Hvas, C. L. and Thiel, S. (2014) The lectin pathway of the complement system is downregulated in Crohn's disease patients who respond to anti-TNF-alpha therapy. *J Crohns Colitis*, 8(6), pp. 521-8.
- Schafer, C. T. and Farrens, D. L. (2014) Conformational Selection and Equilibrium Govern the Ability of Retinals to Bind Opsin. *J Biol Chem*, 10.1074/jbc.M114.603134.
- Schramm, E. C., Clark, S. J., Triebwasser, M. P., Raychaudhuri, S., Seddon, J. M. and Atkinson, J. P. (2014) Genetic variants in the complement system predisposing to age-related macular degeneration: a review. *Mol Immunol*, 61(2), pp. 118-25.
- Schwink, K. L. (1992) Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 8(3), pp. 557-74.

- Scott, B. L. and Bazan, N. G. (1989) Membrane docosaehaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8), pp. 2903-7.
- Shi, L., Ko, M. L., Huang, C. C., Park, S. Y., Hong, M. P., Wu, C. and Ko, G. Y. (2014) Chicken embryos as a potential new model for early onset type I diabetes. *J Diabetes Res*, 2014, pp. 354094.
- Simo, R., Carrasco, E., Garcia-Ramirez, M. and Hernandez, C. (2006) Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*, 2(1), pp. 71-98.
- Simo, R., Higuera, M., Garcia-Ramirez, M., Canals, F., Garcia-Arumi, J. and Hernandez, C. (2008) Elevation of apolipoprotein A-I and apolipoprotein H levels in the vitreous fluid and overexpression in the retina of diabetic patients. *Arch Ophthalmol*, 126(8), pp. 1076-81.
- Simo, R., Villarroel, M., Corraliza, L., Hernandez, C. and Garcia-Ramirez, M. (2010) The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol*, 2010, pp. 190724.
- Singh, R., Shen, W., Kuai, D., Martin, J. M., Guo, X., Smith, M. A., Perez, E. T., Phillips, M. J., Simonett, J. M., Wallace, K. A., Verhoeven, A. D., Capowski, E. E., Zhang, X., Yin, Y., Halbach, P. J., Fishman, G. A., Wright, L. S., Pattnaik, B. R. and Gamm, D. M. (2013) iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet*, 22(3), pp. 593-607.
- Smailhodzic, D., van Asten, F., Blom, A. M., Mohlin, F. C., den Hollander, A. I., van de Ven, J. P., van Huet, R. A., Groenewoud, J. M., Tian, Y., Berendschot, T. T., Lechanteur, Y. T., Fauser, S., de Bruijn, C., Daha, M. R., van der Wilt, G. J., Hoyng, C. B. and Klevering, B. J. (2014) Zinc supplementation inhibits complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One*, 9(11), pp. e112682.
- Sonoda, S., Sreekumar, P. G., Kase, S., Spee, C., Ryan, S. J., Kannan, R. and Hinton, D. R. (2010) Attainment of polarity promotes growth factor secretion by retinal pigment epithelial cells: relevance to age-related macular degeneration. *Aging (Albany NY)*, 2(1), pp. 28-42.
- Sparbier, K., Koch, S., Kessler, I., Wenzel, T. and Kostrzewa, M. (2005) Selective isolation of glycoproteins and glycopeptides for MALDI-TOF MS detection supported by magnetic particles. *J Biomol Tech*, 16(4), pp. 407-13.
- Sparrow, J. R., Hicks, D. and Hamel, C. P. (2010) The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*, 10(9), pp. 802-23.
- Spieß, B. M. (1997) [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 139(3), pp. 126-33.
- Stamer, W. D., Bok, D., Hu, J., Jaffe, G. J. and McKay, B. S. (2003) Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(6), pp. 2803-8.

- Steinberg, J. S., Auge, J., Fleckenstein, M., Holz, F. G. and Schmitz-Valckenberg, S. (2014) Longitudinal Analysis of Reticular Drusen Associated with Age-Related Macular Degeneration Using Combined Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy and Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Imaging. *Ophthalmologica*, 10.1159/000368168.
- Stolz, D. B. and Jacobson, B. S. (1992) Examination of transcellular membrane protein polarity of bovine aortic endothelial cells in vitro using the cationic colloidal silica microbead membrane-isolation procedure. *J Cell Sci*, 103 (Pt 1), pp. 39-51.
- Strauss, O. (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3), pp. 845-81.
- Stuck, M. W., Conley, S. M. and Naash, M. I. (2014) The Y141C knockin mutation in RDS leads to complex phenotypes in the mouse. *Hum Mol Genet*, 10.1093/hmg/ddu345.
- Sun, B. (2014) Proteomics and glycoproteomics of pluripotent stem-cell surface proteins. *Proteomics*, 10.1002/pmic.201400300.
- Swadzba, M. E., Hauck, S. M., Naim, H. Y., Amann, B. and Deeg, C. A. (2012a) Retinal glycoprotein enrichment by concanavalin a enabled identification of novel membrane autoantigen synaptotagmin-1 in equine recurrent uveitis. *PLoS One*, 7(12), pp. e50929.
- Swadzba, M. E., Hirmer, S., Amann, B., Hauck, S. M. and Deeg, C. A. (2012b) Vitreal IgM autoantibodies target neurofilament medium in a spontaneous model of autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(1), pp. 294-300.
- Szober, C. M., Hauck, S. M., Euler, K. N., Frohlich, K. J., Alge-Priglinger, C., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2012) Profound re-organization of cell surface proteome in equine retinal pigment epithelial cells in response to in vitro culturing. *Int J Mol Sci*, 13(11), pp. 14053-72.
- Takahashi, Y., Moiseyev, G., Chen, Y., Nikolaeva, O. and Ma, J. X. (2011) An alternative isomerohydrolase in the retinal Muller cells of a cone-dominant species. *FEBS J*, 278(16), pp. 2913-26.
- Takeuchi, M., Usui, Y., Okunuki, Y., Zhang, L., Ma, J., Yamakawa, N., Hattori, T., Kezuka, T., Sakai, J. and Goto, H. (2010) Immune responses to interphotoreceptor retinoid-binding protein and S-antigen in Behcet's patients with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(6), pp. 3067-75.
- Tan, S., Tan, H. T. and Chung, M. C. (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*, 8(19), pp. 3924-32.
- Tan, X., Takahashi, H., Nishida, J., Aoki, A., Inoue, T. and Yanagi, Y. (2015) Excessive retinol intake exacerbates choroidal neovascularization through upregulated vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelium in mice. *Exp Eye Res*, 131C, pp. 77-83.

- Tang, Y., Wu, S., Liu, Q., Xie, J., Zhang, J., Han, D., Lu, Q. and Lu, Q. (2015) Mertk Deficiency Affects Macrophage Directional Migration via Disruption of Cytoskeletal Organization. *PLoS One*, *10*(1), pp. e0117787.
- Tatituri, R. V., Wolf, B. J., Brenner, M. B., Turk, J. and Hsu, F. F. (2015) Characterization of polar lipids of *Listeria monocytogenes* by HCD and low-energy CAD linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *Anal Bioanal Chem*, 10.1007/s00216-015-8480-1.
- Uauy, R., Hoffman, D. R., Peirano, P., Birch, D. G. and Birch, E. E. (2001) Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids*, *36*(9), pp. 885-95.
- Vanderlugt, C. J. and Miller, S. D. (1996) Epitope spreading. *Curr Opin Immunol*, *8*(6), pp. 831-6.
- Vogel, S., Piantedosi, R., O'Byrne, S. M., Kako, Y., Quadro, L., Gottesman, M. E., Goldberg, I. J. and Blaner, W. S. (2002) Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision. *Biochemistry*, *41*(51), pp. 15360-8.
- Wacker, W. B. and Lipton, M. M. (1965) Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature*, *206*(981), pp. 253-4.
- Wagner, B. (2006) Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol*, *30*(1-2), pp. 155-64.
- Wallace, C. A., Moir, G., Malone, D. F., Duncan, L., Devarajan, G. and Crane, I. J. (2013) Regulation of T-lymphocyte CCL3 and CCL4 production by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *54*(1), pp. 722-30.
- Wang, D., Bhat, R., Sobel, R. A., Huang, W., Wang, L. X., Olsson, T. and Steinman, L. (2014) Uncovering cryptic glycan markers in multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Drug Dev Res*, *75*(3), pp. 172-88.
- Wang, Q., Song, S. K., Zhang, H., Berkowitz, B. A., Chen, S., Wickline, S. A. and Chen, J. (2011) Photoreceptor degeneration changes magnetic resonance imaging features in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Magn Reson Med*, *65*(6), pp. 1793-8.
- Wang, Y., Lu, Q., Gao, S., Zhu, Y., Gao, Y., Xie, B. and Shen, X. (2014) Pigment Epithelium-derived Factor Regulates Glutamine Synthetase and l-Glutamate/l-Aspartate Transporter in Retinas with Oxygen-induced Retinopathy. *Curr Eye Res*, 10.3109/02713683.2014.990639, pp. 1-13.
- Wavre-Shapton, S. T., Meschede, I. P., Seabra, M. C. and Futter, C. E. (2014) Phagosome maturation during endosome interaction revealed by partial rhodopsin processing in retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*, *127*(Pt 17), pp. 3852-61.
- Wen, R., Song, Y., Cheng, T., Matthes, M. T., Yasumura, D., LaVail, M. M. and Steinberg, R. H. (1995) Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J Neurosci*, *15*(11), pp. 7377-85.

- West, K. A., Yan, L., Shadrach, K., Sun, J., Hasan, A., Miyagi, M., Crabb, J. S., Hollyfield, J. G., Marmorstein, A. D. and Crabb, J. W. (2003) Protein database, human retinal pigment epithelium. *Mol Cell Proteomics*, 2(1), pp. 37-49.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. and Williams, K. L. (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, pp. 19-50.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Williams, K. L. and Hochstrasser, D. F. (1996b) Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*, 17(5), pp. 830-8.
- Willermain, F., Libert, S., Motulsky, E., Salik, D., Caspers, L., Perret, J. and Delporte, C. (2014) Origins and consequences of hyperosmolar stress in retinal pigmented epithelial cells. *Front Physiol*, 5, pp. 199.
- Wollscheid, B., Bausch-Fluck, D., Henderson, C., O'Brien, R., Bibel, M., Schiess, R., Aebersold, R. and Watts, J. D. (2009) Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol*, 27(4), pp. 378-86.
- Xu, H., Forrester, J. V., Liversidge, J. and Crane, I. J. (2003) Leukocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(1), pp. 226-34.
- Yao, H., Wang, T., Deng, J., Liu, D., Li, X. and Deng, J. (2014) The development of blood-retinal barrier during the interaction of astrocytes with vascular wall cells. *Neural Regen Res*, 9(10), pp. 1047-54.
- Yoo, B. C., Cairns, N., Fountoulakis, M. and Lubec, G. (2001) Synaptosomal proteins, beta-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (beta-SNAP), gamma-SNAP and synaptotagmin I in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 12(3), pp. 219-25.
- Young, R. W. (1977) The daily rhythm of shedding and degradation of cone outer segment membranes in the lizard retina. *J Ultrastruct Res*, 61(2), pp. 172-85.
- Yu, D. Y. and Cringle, S. J. (2001) Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog Retin Eye Res*, 20(2), pp. 175-208.
- Zareba, M., Szewczyk, G., Sarna, T., Hong, L., Simon, J. D., Henry, M. M. and Burke, J. M. (2006) Effects of photodegradation on the physical and antioxidant properties of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium. *Photochem Photobiol*, 82(4), pp. 1024-9.
- Zhang, Y., Stanton, J. B., Wu, J., Yu, K., Hartzell, H. C., Peachey, N. S., Marmorstein, L. Y. and Marmorstein, A. D. (2010) Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease. *Hum Mol Genet*, 19(6), pp. 1108-18.

- Zhao, Z., Sun, T., Jiang, Y., Wu, L., Cai, X., Sun, X. and Sun, X. (2014) Photooxidative damage in retinal pigment epithelial cells via GRP78 and the protective role of grape skin polyphenols. *Food Chem Toxicol*, 74, pp. 216-24.
- Zheng, Y. Z. and Foster, L. J. (2009) Biochemical and proteomic approaches for the study of membrane microdomains. *J Proteomics*, 72(1), pp. 12-22.
- Zigler, J. S., Jr., Zhang, C., Grebe, R., Sehrawat, G., Hackler, L., Jr., Adhya, S., Hose, S., McLeod, D. S., Bhutto, I., Barbour, W., Parthasarathy, G., Zack, D. J., Sergeev, Y., Luty, G. A., Handa, J. T. and Sinha, D. (2011) Mutation in the betaA3/A1-crystallin gene impairs phagosome degradation in the retinal pigmented epithelium of the rat. *J Cell Sci*, 124(Pt 4), pp. 523-31.
- Zipplies, J. K., Hauck, S. M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2009) Serum PEDF levels are decreased in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 8(2), pp. 992-8.
- Zipplies, J. K., Hauck, S. M., Schoeffmann, S., Amann, B., van der Meijden, C. H., Stangassinger, M., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2010a) Kininogen in autoimmune uveitis: decrease in peripheral blood stream versus increase in target tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(1), pp. 375-82.
- Zipplies, J. K., Kirschfink, M., Amann, B., Hauck, S. M., Stangassinger, M. and Deeg, C. A. (2010b) Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology*, 215(12), pp. 949-55.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg, meiner Doktormutter, für die außerordentlich engagierte und fachlich hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Sie war immer für mich erreichbar und ermöglichte mir meine Arbeit stetig effektiv voranzubringen. Die Überlassung des sehr interessanten Themas und die Chance unter ihrer Leitung zwei Publikationen veröffentlichen zu können, hat in mir eine große Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten geweckt. Vielen herzlichen Dank für alles!

Bei Herrn Prof. Dr. Stangassinger und Herrn Prof. Dr. Göbel möchte ich mich für den am Institut für Tierphysiologie der LMU München zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Stefanie Hauck aus dem Helmholtz Zentrum München für die tatkräftige und sehr hilfreiche Unterstützung bei proteomischen und massenspektrometrischen Fragestellungen sowie für die wertvollen Anregungen bei den Korrekturen der beiden Publikationen.

Ebenfalls möchte ich mich beim gesamten Team der Abteilung für Proteinanalytik des Helmholtz Zentrums München für die stets entgegengebrachte Unterstützung und Gastfreundlichkeit bedanken. Hierbei möchte ich vor allem auch Herrn Prof. Dr. Marius Ueffing für die Möglichkeit danken, die Gerätschaften des Helmholtz Zentrums München nutzen zu dürfen.

Bei Frau PD Dr. Claudia Alge-Priglinger möchte ich mich für ihre Hilfe und fachliche Unterstützung beim Verfassen der ersten Publikation bedanken.

Familie Veit und dem ganzen Team der Pferdemetzgerei Veit danke ich für die Überlassung der Pferdeaugen und die mir entgegengebrachte Herzlichkeit.

Frau Bärbl Amann und Frau Sieglinde Hirmer möchte ich für die großartige Hilfsbereitschaft in allen labortechnischen Angelegenheiten danken. Bärbl danke ich dabei auch ganz besonders für die lustigen Achterbahnfahrten vor dem Mikroskop!

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen Roxane Degroote, Christoph Szober, Ute Klein, Kristina Fröhlich, Nina Burkhardt und Karina Lutterberg für die tolle und unvergessliche Zeit am Institut. Ein ganz großes Dankeschön gilt zunächst Christoph, der mir mit sehr viel Freude das Arbeiten in der Zellkultur beigebracht hat und ohne dessen Vorarbeit es mir nicht möglich gewesen wäre diese Arbeit so zu verfassen. Der verbliebenen Group - Krissi, Nina und Karina - möchte ich dafür danken, dass sie jeden Arbeitstag durch die immer entgegengebrachte Hilfe, gemeinsame Lacher (wohlgemerkt meist auf meine Kosten), muntermachenden Kaffee und ganz viele Krapfen zu einem tollen Tag gemacht haben, von dem ich keinen missen möchte. Vielen Dank, dass ich in Euch so wunderbare Freunde finden konnte!

Meiner lieben Familie danke ich von ganzem Herzen für die bedingungslose Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit. Vor allem meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben, gilt mein ganz besonderer Dank und ist diese Arbeit gewidmet.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem lieben Freund Philip Zehetmaier von ganzem Herzen bedanken. Er war immer für mich da, fand stets die richtigen aufmunternden und motivierenden Worte und unterstützte mich wo er nur konnte. „You and I've got what it takes to make it“.