

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR AUGENHEILKUNDE
PROF. DR. HORST HELBIG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VESIKULÄRE SEKRETIONSMECHANISMEN IN DEN MÜLLERZELLEN DER
NETZHAUT

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anne Pohl

2021

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR AUGENHEILKUNDE
PROF. DR. HORST HELBIG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VESIKULÄRE SEKRETIONSMECHANISMEN IN DEN MÜLLERZELLEN DER
NETZHAUT

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anne Pohl

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Jägle

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Antje Grosche

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Die Retina.....	10
1.2 Die Müllerzelle, eine besondere retinale Gliazelle.....	12
1.3 Gliotransmission und molekulare Grundlagen in einer Zelle zur exozytotischen Sekretion.....	15
1.3.1 Vesikel-assoziierte Membranproteine (VAMPs) und ihr Knockout im transgenen Mausmodell	17
1.3.2 Vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUTs)	20
1.3.3 Exosomen	21
1.4 Zielsetzung der Doktorarbeit.....	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Versuchstiere	26
2.1.2 Stocklösungen	28
2.1.3 Gebrauchsfertige Lösungen.....	29
2.1.4 Kits	31
2.1.5 Enzyme	31
2.1.6 Oligonukleotide	31
2.1.7 Chemikalien	33
2.1.8 Antikörper	34
2.1.9 Verbrauchsmaterial	36
2.1.10 Geräte.....	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Bestimmung der Maus-Genotypen.....	38
2.2.2 Präparation der murinen Retina.....	39
2.2.3 Histologische Untersuchungen.....	40
2.2.3.1 Herstellung und Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten	40
2.2.3.1.1 Anfertigung von Retinaschnitten	40
2.2.3.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten	40
2.2.3.2 Herstellung und Immunfluoreszenzfärbung von retinalen Flachpräparaten	41

2.2.4	Müllerzellisolation mittels MACS® Cell Separation	42
2.2.4.1	Vorbereitung der Zellsuspension	42
2.2.4.2	Isolation von Müllerzellen, Endothelzellen, Neuronen und Mikroglia aus der Netzhaut	43
2.2.4.3	Reinheitsprüfung der Zellpopulationen.....	45
2.2.5	RNA-Isolation	46
2.2.6	cDNA-Synthese.....	47
2.2.7	TaqMan® Real-Time PCR.....	48
2.2.7.1	Probenvorbereitung	50
2.2.7.2	Auftragen und Auswerten der Proben	50
2.2.8	Proteinisolation.....	50
2.2.8.1	Isolation von Gesamtprotein	51
2.2.8.2	Isolation von Membranproteinen	51
2.2.8.3	Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration	52
2.2.9	Immunpräzipitation	53
2.2.10	Western Blot.....	54
2.2.10.1	Proteininvorbereitung.....	55
2.2.10.2	Herstellung der Polyacrylamid-Gele	55
2.2.10.3	SDS-Page und Blotting	55
2.2.10.4	Nachweis der gesuchten Proteine.....	56
2.2.11	Isolation von Exosomen	58
2.2.11.1	Zellkultur aus den Zellfraktionen der Retina	58
2.2.11.2	Isolation von Exosomen-RNA (Firma QIAGEN).....	58
2.2.11.3	Exosomen-Isolation (Firma Invitrogen).....	59
3.	Ergebnisse	61
3.1	Müllerzellisolation aus der Retina.....	61
3.1.1	Histologische Reinheitskontrolle der mittels MACS®-Technik isolierten Müllerzellfraktion.....	61
3.1.2	TaqMan®-PCR zur Validierung des MACS®-Protokolls zur Anreicherung retinaler Zelltypen.....	62
3.2	Analyse der molekularen Grundlagen für Gliotransmission in Müllerzellen	63

3.2.1	Expression von vesikulären Glutamat-Transportern (VGLUTs) in der Retina ...	63
3.2.2	Charakterisierung von Vesikel-assoziierten Membranproteinen (VAMPs) in der Retina	65
3.2.2.1	VAMP-Expressionsanalyse mittels quantitativer TaqMan®-PCR	65
3.2.2.2	Darstellung von VAMP3, VAMP5 und VAMP7 mittels Western Blot	66
3.2.2.3	Immunpräzipitation zur Identifikation von Interaktionspartnern Müllerzell-spezifischer VAMPs.....	68
3.2.2.4	Subzelluläre Lokalisation von VAMP5 in Müllerzellen der Maus.....	76
3.2.3	Exosomen als möglicher Sekretionsmechanismus.....	78
3.3	Einfluss der Müllerzell-spezifischen funktionellen Inaktivierung von VAMP1-3 sowie des Knockouts von VAMP7 auf Morphometrie, VAMP- und VGLUT-Expression in der Retina.....	79
3.3.1	Validierung des transgenen Mausmodells mittels qPCR	79
3.3.1.1	Validierung der Müllerzell-spezifischen Expression von Botulinumtoxin (BoNT)	79
3.3.1.2	Analyse der Expression von VAMP7 in der VAMP7-Knockout-Maus	80
3.3.2	Analyse der Zellfraktionen der Retina anhand Zelltyp-spezifischer Marker im transgenen Mausmodell.....	80
3.3.3	Morphometrische Analyse der retinalen Integrität im transgenen Mausmodell ..	81
3.3.3.1	Analyse von Retinaschnitten unterschiedlicher Genotypen	81
3.3.3.2	Analyse von Mikroglia in retinalen Flachpräparaten unterschiedlicher Genotypen	83
3.3.4	Analyse der VAMP-Expression in der Retina der transgenen Maus	85
3.3.5	Retinale Expression von VGLUT3 im transgenen Mausmodell	86
4.	Diskussion.....	87
4.1	Protokolletablierungen und transgenes Mausmodell.....	87
4.1.1	Etablierung und Validierung des Müllerzellisolationsprotokolls.....	87
4.1.2	Proteinnachweise mittels Western Blot.....	89
4.1.3	Validierung des transgenen Mausmodells.....	91
4.2	Interpretation der Ergebnisse zu Endothelzellen, Mikroglia und Neuronen der Retina.....	91
4.2.1	Mikroglia.....	92
4.2.2	Endothelzellen.....	94

4.2.3	Neuronen	95
4.3	Müllerzellen exprimieren wichtige Komponenten zur vesikulären Freisetzung von Glutamat	97
4.3.1	Müllerzellen exprimieren insbesondere VGLUT3.....	97
4.3.2	VAMP5 als entscheidendes Vesikel-assoziiertes Membranprotein in Müllerzellen	98
4.3.3	Exosomen – von Müllerzellen freigesetzte Transportvehikel zur Gliotransmission?	102
5.	Zusammenfassung	105
6.	Abkürzungsverzeichnis	108
7.	Literaturverzeichnis	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Säugernetzhaut	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der exozytotischen Freisetzung von Glutamat <td>17</td>	17
Abbildung 3: Der SNARE-Komplex synaptischer Vesikel	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biogenese von Exosomen	22
Abbildung 5: Ausgewählte Funktionen von Exosomen und einzelne Forschungsansätze....	24
Abbildung 6: iBot-Mausmodell zur Müllerzell-spezifischen Expression von BoNT (CreER ^{T2} x iBot-Transgen).	27
Abbildung 7: Präparationsschritte der Mausretina.	39
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zellseparation mittels MACS®-System.	43
Abbildung 9: Schema der TaqMan®-PCR.	49
Abbildung 10: Schema der Immunpräzipitation.....	53
Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopie der Zellfraktionen nach Isolation aus der Retina mittels MACS®-Technik.	62
Abbildung 12: Validierung der Anreicherung der aus Retina isolierten Zellpopulationen mittels quantitativer PCR für Zelltyp-spezifische Marker.	63
Abbildung 13: Expression der VGLUT-Subtypen in der Gesamtretina (quantitative PCR)...	64
Abbildung 14: Expression der VGLUT-Subtypen in den unterschiedlichen retinalen Zellpopulationen (quantitative PCR).	65
Abbildung 15: Expression der einzelnen VAMPs in den unterschiedlichen retinalen Zellpopulationen (quantitative PCR).	66
Abbildung 16: Western Blots für VAMP3, VAMP5, VAMP7 und Beta-Aktin.	67
Abbildung 17: Graphische Darstellung der in der Immunpräzipitation mit VAMP5 kopräzipitierten Proteine.	75
Abbildung 18: Mikroskopische Charakterisierung von VAMP5 in der Müllerzelle.....	77
Abbildung 19: Western Blot von aus Müllerzellen isolierten Exosomen für den Exosomenmarker CD63.	79
Abbildung 20: Vergleich der Expression von Botulinumtoxin zwischen Neuronen und Müllerzellen im Wildtyp und in bigenen iBot-Mäusen (GlastCreER ^{T2} x iBot-Transgen) anhand einer quantitativen PCR.	80
Abbildung 21: Expression Zelltyp-spezifischer Marker in mittels MACS®-System aus der Retina isolierten Zellfraktionen in den unterschiedlichen Genotypen (quantitative PCR).	81

Abbildung 22: Vergleich der Morphometrie der Netzhaut in unterschiedlichen Genotypen anhand von Retinaschnitten.....	82
Abbildung 23: Vergleich der Genotypen bezüglich der Zellzahl in den unterschiedlichen Retinaschichten, Dicke der IPS und Anzahl der Calretinin-positiven Zellen abhängig von der Retinaschicht.....	82
Abbildung 24: Immunfluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Morphometrie von Mikroglia in retinalen Flachpräparaten.....	84
Abbildung 25: Histologischer Vergleich der Mikrogliazellen von Wildtyp-, VAMP7-KO- und VAMP7-KO x iBot-Mäusen bezüglich der Zellzahl, des Somaareals, der durch die Zelle insgesamt okkupierten Fläche und des jeweiligen Verhältnisses zwischen IPS und ÄPS im retinalen Flachpräparat.....	84
Abbildung 26: Expression von Mitgliedern der VAMP-Familie in Müllerzellen der verschiedenen Mauslinien zum funktionellen Knockout verschiedener VAMPs (quantitative PCR).....	85
Abbildung 27: Expression der VAMP-Subtypen in den unterschiedlichen retinalen Zellpopulationen und genetischen Hintergründen mittels quantitativer PCR.....	86
Abbildung 28: Expression von VGLUT3 in der Wildtyp- und VAMP7-Knockout-Maus anhand einer quantitativen PCR.....	86
Abbildung 29: VGLUT- und VAMP-Expression in verschiedenen Zelltypen der juvenilen Mausretina (Postnataltag 14) nach Macosko et al. 2015.....	94
Abbildung 30: Müllerzellen exprimieren wichtige Moleküle zur Kalzium-abhängigen vesikulären Exozytose von Glutamat.....	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vesikel-assoziierte Membranproteine in der Maus.....	19
Tabelle 2: In meiner Doktorarbeit verwendete Mauslinien.....	26
Tabelle 3: Pipettierschema für die Genotypisierungs-PCR aus Schwanzspitzen.....	39
Tabelle 4: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten	41
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten....	41
Tabelle 6: Für die MACS®-Zellisolation verwendete Volumina	45
Tabelle 7: Antikörperschema für die Immunfluoreszenzfärbungen der aufgereinigten Zellen	46
Tabelle 8: Pipettierschema für den Mastermix der cDNA-Synthese	48
Tabelle 9: Konditionen der cDNA-Synthese im MasterCycler.....	48
Tabelle 10: Mastermix für die TaqMan®-PCR (pro cDNA-Probe)	50
Tabelle 11: Pipettierschema für den BSA-Standard zur colorimetrischen Konzentrationsbestimmung nach Bradford	53
Tabelle 12: Pipettierschema zur Herstellung von 2 Polyacrylamid-Gelen	55
Tabelle 13: Konditionen der Gelelektrophorese und des Blottings beim Western Blot	56
Tabelle 14: Etablierte Western Blot-Konditionen für den Proteinnachweis in der Retina	57
Tabelle 15: Reinheit der Müllerzellfraktion nach Isolation aus der Retina mittels MACS®-Technik	61
Tabelle 16: Vergleich der zwei verwendeten Methoden zur Membranproteinisolation anhand der durchschnittlich pro Retina erzielten Proteinkonzentration	67
Tabelle 17: Daten der massenspektrometrischen Analyse der Immunpräzipitation in Gesamtretina mit dem VAMP5-Antikörper im Vergleich zu einer unspezifischen Isotyp-Kontrolle.....	69
Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der mit VAMP5 präzipitierten Proteine am Beispiel zellulärer Komponenten mit zugehöriger Signalweg-ID, Anzahl Zählungen im Datensatz und farblicher Markierung	76

1. Einleitung

In den letzten Jahren und Jahrzehnten ist die Forschung in den Neurowissenschaften, der Neurophysiologie und Neurologie auf dem Vormarsch. Mittlerweile kann man das Voranschreiten von vielen neurodegenerativen und neuroimmunologischen Krankheiten bereits deutlich verlangsamen. Als Beispiel seien die Therapie der Multiplen Sklerose und die diesbezüglichen Fortschritte im Langzeitverlauf genannt: Laut einer US-amerikanischen Studie waren knapp 17 Jahre nach Diagnosestellung noch fast 90 % der Patienten ohne Hilfe gehfähig (Cree et al. 2016). Anhand epidemiologischer Studien weiß man, dass ohne Therapie nach demselben Zeitraum nur circa 50 % der Patienten ohne Gehhilfe oder Rollstuhl ausgekommen wären. Dieselben Studien erinnern jedoch auch daran, dass in dieser Hinsicht nach wie vor Bedarf an weiterführenden Therapien besteht: Für den einzelnen Patienten können weiterhin schwere Einschränkungen bestehen und Multiple Sklerose bleibt noch immer eine „unheilbare Krankheit“ (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 27.10.2016).

Der Weg von der Grundlagenforschung bis zum letztlichen Nutzen für den Patienten ist lang. Die vielfältigen klinischen Fortschritte, die daraus resultieren, geben diesen Bestrebungen jedoch immer wieder aufs Neue Recht. Grundlagenforschung im Bereich der Neurophysiologie bewegt sich, wie auch die Experimente dieser Arbeit, einerseits im interdisziplinären Umfeld aus Neurowissenschaften, Biologie und Anatomie. Andererseits können neue Erkenntnisse in diesem Bereich oft für viele unterschiedliche klinische Fächer von Nutzen sein. Ein besseres Verständnis neurobiologischer Prozesse und pathologischer Veränderungen im Auge beispielsweise kann nicht nur neue Erkenntnisse über ophthalmologische Erkrankungen bringen, sondern auch in Bezug auf das gesamte zentrale Nervensystem (ZNS), einschließlich neuroimmunologischer Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose. In dieser experimentellen Arbeit sollten deshalb vesikuläre Sekretionsmechanismen in Müllerzellen - Gliazellen der Netzhaut des Auges - untersucht werden.

1.1 Die Retina

Die Retina enthält die ersten drei Schaltstationen der Sehbahn. Dabei stellen die Photorezeptoren (Stäbchen- und Zapfenzellen), welche Lichtreize in elektrochemische Signale umwandeln, das erste Neuron in dieser Signalverarbeitungskette dar. Die Information wird von ihnen an die Bipolarzellen als zweites Neuron weitergeleitet, und von dort an das dritte Neuron, die Ganglionzellen (für die Stäbchen erfolgt dies zusätzlich über die Amakrinzellen). Die

Axone der Ganglienzellen vereinigen sich in der Papille zum Nervus opticus und leiten die Sehinformationen über diesen an das Zwischenhirn weiter (Behrends 2010, S. 635).

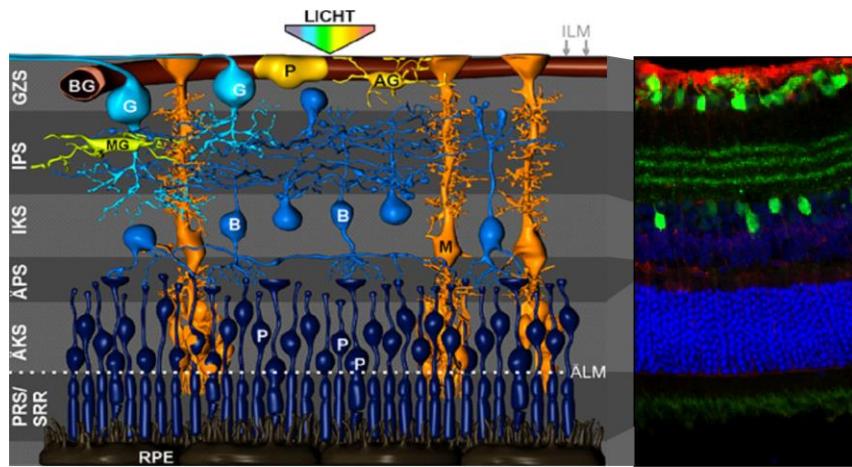


Abbildung 1: Schematische (links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts) Darstellung der Säugernetzhaut.
ILM/ÄLM: innere/äußere limitierende Membran; GZS: Ganglienzellschicht; IPS/ÄPS: innere/äußere plexiforme Schicht; IKS/ÄKS: innere/äußere Körnerschicht; PRS/SRR: Photorezeptorsegmente/Subretinalraum; RPE: retinales Pigmentepithel; BG: Blutgefäß; G: Ganglienzelle; AG: Astroglia; MG: Mikroglia; B: Bipolarzelle; M: Müllerzelle; P (weiß): Photorezeptor; P (schwarz): Perizyt; H: Horizontalzelle; A: Amakrinzelle.

Histologisch ist die Retina streng in mehrere Schichten gegliedert (Abb. 1). Den Abschluss zur äußeren Augenhülle, der Sklera und dem Choroid, bildet das Pigmentepithel. Dem schließt sich nach innen die Neuroretina an: Ihre äußere Barriere ist die äußere limitierende Membran (ÄLM), das sind Zell-Zell-Kontakte zwischen Photorezeptoren und Müllerzellen. Es folgen - von außen nach innen - die äußere Körnerschicht (ÄKS), welche die Zellkörper der Photorezeptoren umfasst, während sich in der äußeren plexiformen Schicht (ÄPS) deren Synapsen mit dem zweiten Schaltneuron der Sehbahn, den Bipolarzellen, befinden. Entsprechend bilden die Zellkörper der Bipolarzellen, aber auch die der Horizontal-, Amakrin- und Müllerzellen, die innere Körnerschicht (IKS). Die angrenzende innere plexiforme Schicht (IPS) mit Synapsen zwischen zweitem und drittem Neuron und Synapsen mit den Amakrinzellen grenzt nach innen an die Ganglienzellschicht (GZS), welche durch die Zellkörper der Ganglienzellen gebildet wird. Die innere Begrenzung der Netzhaut zum Glaskörper erfolgt durch die innere limitierende Membran (ILM) - eine Basallamina, die von den Endfüßen der Müllerzellen gebildet wird (Lüllmann-Rauch 2009, S. 587–595).

Die Blutversorgung der Retina geschieht von zwei Seiten: Die Arteria centralis retinae tritt über den Sehnerv ein und versorgt die inneren Retinaschichten bis zur inneren Körnerschicht. Die Photorezeptorzellen hingegen werden aus der Choroidea versorgt (Lüllmann-Rauch 2009, S. 594). Die im Auge bestehende Blut-Netzhaut-Schranke wird aus den Endothelzellen der retinalen Blutgefäße und dem retinalen Pigmentepithel (RPE) gebildet (Lüllmann-Rauch und

Asan 2019, S. 718). Sie ist eine Voraussetzung für retinale Zellfunktionen und akkurate Sehen. Der Rolle endothelialer Dysfunktion in der Blut-Retina-Schranke als Folge endothelialer Aktivierung wird in Bezug auf die Initiierung und das Fortschreiten neurovaskulärer Erkrankungen eine immer größere Bedeutung beigemessen (Lenin et al. 2018).

1.2 Die Müllerzelle, eine besondere retinale Gliazelle

Die Retina geht entwicklungsbiologisch aus dem Diencephalon hervor (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 692) und ist als „vorgeschobener Hirnanteil“ Teil des ZNS (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 710). Wie das Gehirn besteht sie unter anderem aus neuronalen Zellen und Gliazellen. Gliazellen sind nicht-neuronale Zellen, die synaptische Verbindungen im ZNS umgeben (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 211). Die Neuronen der Netzhaut sind Photorezeptoren, Bipolar-, Ganglien-, Horizontal- und Amakrinzellen (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 710).

Die häufigsten Gliazellen des ZNS sind die Makrogliazellen Astrozyten (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 232-233). Sie übernehmen in ihm wichtige Aufgaben. So kontrollieren sie die Zusammensetzung der Extrazellularflüssigkeit, indem sie zum Beispiel die extrazelluläre Kaliumkonzentration konstant halten (Behrends et al. 2017, S. 35). Zudem sind sie am Recycling und der Metabolisierung von Neurotransmittern beteiligt (Pfrieger 2010; Slezak et al. 2012). Auf eine Schädigung des neuronalen Gewebes reagieren Makroglia mit einer reaktiven Gliose, was zur Ausbildung einer Glianarbe führen kann. Hierbei proliferieren die Zellen und vergrößern sich (sie werden hypertroph) als Reaktion auf neuronale Degeneration (Kuhrt et al. 2008; Bringmann et al. 2009; Hirrlinger et al. 2010). Außerdem können Gliazellen Substanzen freisetzen, mithilfe derer sie mit Neuronen interagieren bzw. kommunizieren können (Halassa und Haydon 2010; Araque und Navarrete 2010; Navarrete et al. 2013). Entsprechend wird ihnen eine wichtige Rolle bei der Informationsverarbeitung im Nervensystem und letztlich auch im Rahmen pathologischer Gewebsveränderungen zugesprochen.

In der Netzhaut finden sich drei Arten von Gliazellen: Die Astrozyten, die Mikroglia und die Müllerzellen (Behar-Cohen et al. 2020).

Die Astrozyten der Retina umschließen mit ihren Fortsätzen retinale Blutgefäße und tragen u.a. zur retinalen Homöostase und zum Erhalt der Blut-Retina-Schranke bei (Vecino et al. 2016). Mikroglia sind die Gewebsmakrophagen der Retina. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Netzhautentwicklung und modulieren die Immunhomöostase der Retina (Li et al.

2019a). Des Weiteren können sie ebenso wie Müllerzellen die neuronale Aktivität regulieren (Silverman und Wong 2018). Entsprechend wird ihre Aktivität mit degenerativen Netzhautveränderungen in Zusammenhang gebracht wie beispielsweise dem Glaukom, der Retinitis pigmentosa oder der altersabhängigen Makuladegeneration (Silverman und Wong 2018). Die Modulation der Mikroglia als eine mögliche therapeutische Strategie für diese Retinaerkrankungen stellt somit ein wichtiges Gebiet der Netzhautforschung dar (Karlstetter et al. 2015; Rashid et al. 2019).

Die für die Retina typischen Makrogliazellen sind die Müllerzellen, sie sind mit der Astroglia des ZNS vergleichbar (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 710) und machen ca. 90% der retinalen Gliazellen aus (Vecino et al. 2016). Müllerzellen haben die Besonderheit, dass sie nach ihrer Entwicklung und finalen Differenzierung die Morphologie der sogenannten Radialglia beibehalten. Radialglia generieren während der Hirnentwicklung Neuronen (Vecino et al. 2016) und dienen ihnen als Leitschiene zur Migration, beispielsweise in die verschiedenen Cortexschichten (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 235). Im Gehirn verschwinden Radialglia nach Abschluss der Neurogenese. Im Gegensatz dazu differenzieren sie in der Netzhaut nach Abschluss der Neurogenese in funktionale Müllerzellen (Lüllmann-Rauch 2009, S. 185). Die gesamte Retina durchziehend, stehen die Müllerzellfortsätze in engem Kontakt mit allen retinalen Neuronen und deren synaptischen Kontakten (Reichenbach und Bringmann 2013). Ihre Somata liegen in der inneren Körnerschicht (Vecino et al. 2016; Kapitel 1.1, Abb. 1).

Müllerzellen vereinen in sich viele Funktionen, die im ZNS durch unterschiedliche Gliazelltypen ausgeübt werden, beispielsweise scheinen sie über eine ähnliche Glutamatfreisetzung wie Astrozyten zu verfügen (Grosche 2013). Aufgrund dessen können sie als eine Art „Modellglia“ fungieren, weshalb neue Erkenntnisse über Müllerzellen gegebenenfalls auch auf die verschiedenen Gliazelltypen des ZNS übertragen werden können. Darüber hinaus sind Müllerzellen jedoch noch zusätzlich einige weitere interessante Besonderheiten zu eigen, die für die Funktion der Retina essentiell sind:

Da sich in der Retina entwicklungsbiologisch die Photorezeptorzellen skleralseitig befinden, muss Licht nach Auftreffen auf die Retina zunächst alle inneren Schichten der Retina passieren, um von den Photorezeptoren detektiert werden zu können (Kapitel 1.1, Abb. 1). Frühere Arbeiten zeigten, dass Müllerzellen die intraretinale Lichtleitung optimieren und somit einen dadurch bedingten Auflösungsverlust minimieren (Franze et al. 2007; Agte et al. 2011). Zudem vermitteln sie die retinale Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Homöostase (Bringmann et al. 2006) und die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke (Shen et al. 2012), regulieren den retinalen Blutfluss (Metea und Newman 2006) und sind vermutlich auch zur Phagozytose fähig

(Francke et al. 2001). Neuere Studien wiesen darauf hin, dass Müllerzellen die Mikrogliareaktion in Richtung einer protektiven Antwort lenken und so ein anti-inflammatorisches Umfeld in der Retina erzeugen könnten (Wang et al. 2014; Grosche et al. 2016; Mages et al. 2019). Andererseits spielen Müllerzellen auch eine Rolle bei einigen ophthalmologischen Erkrankungen, beispielsweise der diabetischen Retinopathie, was ihre zentrale Rolle in der Retina weiter unterstreicht (Jakobiec et al. 1983; Hauck et al. 2007; Coughlin et al. 2017; Ghaseminejad et al. 2020).

Besonders interessant ist, dass Müllerzellen die Aktivität retinaler Neuronen sowohl indirekt als auch direkt beeinflussen (Bringmann et al. 2006). Synaptische Aktivität hängt einerseits von der präsynaptischen Neurotransmittersekretion und andererseits von der Wiederaufnahme des Transmitters in die Zellen ab. Müllerzellen beeinflussen synaptische Aktivität, indem sie Neurotransmitter aufnehmen, recyceln und Neuronen mit Transmitter-Vorläufern versorgen. Sie exprimieren Wiederaufnahme- und Austauschsysteme für unterschiedliche Neurotransmitter, z. B. für Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Biedermann et al. 2002; Bringmann et al. 2013).

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter in der Wirbeltier-Retina (Bringmann et al. 2013). Nach der synaptischen Aktion wird er in der inneren Retina vor allem von Müller- und Amakrinzellen, in der äußeren Retina fast nur von Müllerzellen durch Natrium- und Chlorid-abhängige GABA-Transporter (GAT) wieder aufgenommen, was eine pathologische extrazelluläre GABA-Akkumulation verhindert (Biedermann et al. 2002; Bringmann et al. 2013). Hingegen ist der wichtigste exzitatorische Transmitter innerhalb der Retina und des Gehirns Glutamat (Bringmann et al. 2013; Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 228). In der Neuroretina sind Photorezeptoren, Neuronen und Makrogliazellen mithilfe von Glutamat-Transportern (GLT) für die Glutamat-Wiederaufnahme ausgestattet, in der inneren Retina jedoch übernehmen Müllerzellen den Großteil der Wiederaufnahme von Glutamat (Bringmann et al. 2013). Dieses wandeln sie über den glialen Glutamat-Glutamin-Zyklus mittels Glutaminsynthetase in Glutamin um, das wiederum den Nervenzellen als Vorläufer für die neuronale Glutamatsynthese zur Verfügung gestellt wird (Pow und Robinson 1994; Higgs und Lukasiewicz 1999; Bringmann et al. 2013). Dabei handelt es sich um einen essentiellen und streng regulierten Prozess, da einerseits bereits geringe Mengen extrazellulären Glutamats neurotoxisch wirken können (Izumi et al. 1999; Rossi et al. 2007), es jedoch andererseits zentral für die synaptische Aktivität von Neuronen ist (Bringmann et al. 2013). Blockiert man die Müllerzell-spezifische Glutaminsynthetase, kann es konsekutive aufgrund des sinkenden

Glutamats in Neuronen bereits nach ca. 2 Minuten zur funktionellen Erblindung kommen (Barnett et al. 2000).

Interessanterweise deuteten weitere Studien darauf hin, dass Müllerzellen die neuronale Aktivität nicht nur, wie eben erläutert, indirekt über die Beendigung von synaptischer Aktivität durch Neurotransmitter-Clearance aus dem synaptischen Spalt beeinflussen, sondern auch direkt mittels selbständiger Freisetzung von Transmittern, den sogenannten „Gliotransmittern“ (Newman 2004).

1.3 Gliotransmission und molekulare Grundlagen in einer Zelle zur exozytotischen Sekretion

Welche Rolle Gliazellen genau in der direkten Informationsweitergabe im ZNS spielen, ist eine in den Neurowissenschaften kontrovers diskutierte Frage. Bis vor einigen Jahren noch ging man davon aus, dass ausschließlich Nervenzellen zur streng regulierten Transmitterfreisetzung fähig sind. In den letzten 20 Jahren fanden sich jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass auch Gliazellen, denen vorher eher primär die Funktion supportiver Hüll- oder Stützzellen zugeschrieben wurde, zu aktiver Signalübertragung fähig sind (Araque et al. 1999). Dies führte zu einem Paradigmenwechsel in den Neurowissenschaften und ein neues Forschungsfeld tat sich auf: Das Modell der „Gliotransmission“ wurde entwickelt. Das Ausmaß der physiologischen Relevanz dessen ist jedoch weiterhin nur teilweise verstanden, sodass das Themengebiet hochaktuell ist (Hamilton und Attwell 2010; Nedergaard und Verkhratsky 2012; Fiacco und McCarthy 2018; Savtchouk und Volterra 2018; Lenk et al. 2019; Kofuji und Araque 2020). Gliotransmitter wie Glutamat, ATP (Adenosintriphosphat) und Adenosin spielen eine wichtige Rolle zum Erhalt essentieller Zellfunktionen, z. B. der Volumenregulation (Wurm et al. 2009). Für kognitive Funktionen und Dysfunktionen scheinen Glutamat und Serin als Gliotransmitter eine besondere Relevanz zu haben (Halassa und Haydon 2010), da beide unter anderem an der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-abhängigen Neurotoxizität beteiligt sind (Bezzi et al. 2001; Inoue et al. 2008). In Studien konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass gerade Glutamat als Gliotransmitter die neuronale Erregbarkeit und die synaptische Transmission erhöht (Ben Achour und Pascual 2012).

Bezüglich des Mechanismus zur Aktivierung von Gliotransmission wurde in Astrozyten bereits das Modell der *tripartiten Synapse* entwickelt (Araque et al. 1999). Es basiert auf der Beobachtung, dass die Aktivierung von Astrozyten durch Neurotransmitter die Freisetzung von „Gliotransmittern“ triggerte. Diese könnten wiederum direkt die synaptische Aktivität regulieren, indem sie an neuronalen Rezeptoren wirken, die dann ihrerseits die erhaltenen

Informationen modulieren und weitergeben (Araque et al. 1999; Jourdain et al. 2007; Perea et al. 2009; Halassa und Haydon 2010; Parpura und Verkhratsky 2012; Martineau 2013; Araque et al. 2014).

Hinsichtlich des Freisetzungsmechanismus der Gliotransmitter hingegen werden drei unterschiedliche Wege diskutiert: Eine Möglichkeit wäre die Sekretion mittels Diffusion durch Membrankanäle (z. B. Volumen-aktivierte Chloridkanäle), eine andere eine direkte reverse Freisetzung durch Transporter, z. B. Glutamat-Transporter (Kettenmann und Verkhratsky 2011).

Ein dritter möglicher Weg ist die Freisetzung durch Kalzium-abhängige Exozytose mithilfe sekretorischer Organellen (Zorec et al. 2012; Martineau 2013). Dieser erinnert an die bei Neuronen beschriebene Kaskade der Transmitterfreisetzung (Kettenmann und Verkhratsky 2011; Abb. 2): In synaptischen Terminalen von Nervenzellen öffnen sich aufgrund der Aktionspotential-vermittelten Depolarisation spannungsabhängige Kalziumkanäle. Die daraus resultierende intrazelluläre Kalziumzunahme führt zur Verschmelzung synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran und der Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Die Fusion der Vesikel- und präsynaptischen Membran wird hierbei durch SNARE-Proteine, die *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*, vermittelt (Bear et al. 2018, S. 132–133; Abb. 2).

Wenn nun Glutamat auch durch exozytotische Vesikelfreisetzung aus Gliazellen ausgeschüttet werden kann, könnte es womöglich die schnelle Signalverarbeitung von Nervenzellen direkt modulieren, aber auch unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise einer Ischämie zur neuronalen Übererregung beitragen (Hamilton und Attwell 2010; Nedergaard und Verkhratsky 2012; Wagner et al. 2017).

Mehrere unabhängige Studien konnten die Kalzium- und SNARE-abhängige Gliotransmitterfreisetzung aus unterschiedlichen Gliazelltypen mit konsekutive induzierter physiologischer Reaktion an Nerven- oder Gliazellen bereits belegen (Bezzi et al. 1998; Montana et al. 2006; Marchaland et al. 2008; Parpura und Zorec 2010; Perea und Araque 2010; Liu et al. 2011a; Slezak et al. 2012; Martineau 2013; Navarrete et al. 2013; Wagner et al. 2017). Speziell auf Müllerzellen bezogen ist bisher bekannt, dass sie die neuronale Arbeit beeinflussen, unter anderem durch die Freisetzung von Glutamat (Newman und Zahs 1998; Slezak et al. 2012), aber auch Serin (Stevens et al. 2003) und ATP (Newman 2003). In neueren Studien gab es Hinweise darauf, dass auch in Müllerzellen exozytotische Glutamatreisetzung möglich ist (Linnertz et al. 2011; Brückner et al. 2012; Slezak et al. 2012) und dass in der Retina

sogar ein Zusammenhang zwischen der glialen SNARE-abhängigen Exozytose und Neurodegeneration besteht (Wagner et al. 2017). Für ATP und Adenosin hingegen konnte eine vesikuläre Freisetzung nahezu ausgeschlossen werden (Brückner et al. 2012; Wagner et al. 2017).

Um dies weiter zu untersuchen, ist zu bedenken, dass eine Ausschüttung von Glutamat durch exozytotische Vesikelfreisetzung aus Gliazellen prinzipiell nur möglich ist, wenn diese über die hierzu nötigen molekularen Grundlagen verfügen. Das sind z. B. SNARE-Proteine, Glutamat-Transporter und exozytotische Vesikel (Abb. 2). Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Gliazelltypen SNARE-Proteine (Montana et al. 2004; Wilhelm et al. 2004; Schubert et al. 2011), vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUTs) (Ormel et al. 2012; Verderio et al. 2012) und vesikuläre Organellen zur Exozytose von Glutamat (Bezzi et al. 2004; Wilhelm et al. 2004; Zhang et al. 2004) aufweisen.

Ob auch die Modellglia Müllerzelle über diese drei erwähnten, im Folgenden näher beleuchteten molekularen Komponenten vesikulärer Sekretion verfügt und so weiterer Anhalt für eine exozytotische Gliotransmission aus Müllerzellen besteht, ist Gegenstand aktueller Forschung und sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

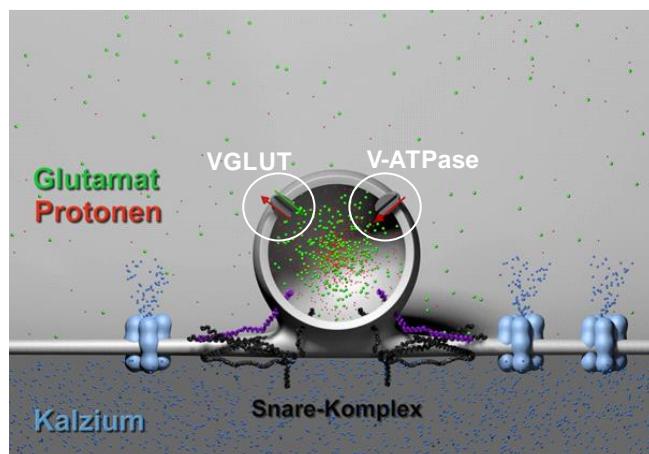


Abbildung 2: Schematische Darstellung der exozytotischen Freisetzung von Glutamat. Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle mit konsekutivem Kalziumeinstrom und Anlagerung eines sekretorischen Vesikels an die Zellmembran mit Bildung des SNARE-Komplexes. Im nächsten Schritt fusioniert das Vesikel mit der Plasmamembran und Glutamat wird in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Der Rücktransport von Glutamat in synaptische Vesikel geschieht mithilfe von Protonen-abhängigen vesikulären Glutamat-Transportern (VGLUTs). Der Protonen-Gradient wird durch eine vesikuläre(V)-ATPase („Protonenpumpe“) aufrechterhalten.

1.3.1 Vesikel-assoziierte Membranproteine (VAMPs) und ihr Knockout im transgenen Mausmodell

In jeder eukaryotischen Zelle können Organellen mithilfe von Transportvesikeln miteinander kommunizieren. Hierfür sind die bereits erwähnten SNARE-Proteine nötig (Kapitel 1.3, Abb. 2; Abb. 3). Das sind membranständige Proteine, die miteinander interagieren und so das Andocken der Membranen vermitteln. Dabei befinden sich die *v-SNAREs* in der Vesikelmembran, die *t-SNAREs* in der Target-, also Zielmembran (Rassow 2008, S. 357).

Damit beide Membranen fusionieren können, müssen drei bis vier SNARE-Proteine in einem SNARE-Komplex interagieren. Dieser besteht immer jeweils aus einem Bündel von drei bis vier *coiled-coil Helices*, zusammengesetzt aus einem *v-SNARE*-Protein und zwei oder drei *t-SNARE*-Proteinen (Bonifacino und Glick 2004; Jahn und Scheller 2006). Da einige SNAREs sowohl in der Vesikel- als auch in der Zielfembran sitzen können, ergab sich in den letzten Jahren zusätzlich auch eine alternative Klassifikation in *R-SNAREs* und *Q-SNAREs*. Diese erfolgt nach strukturellen Gesichtspunkten abhängig von der im Komplex interagierenden Aminosäure, wobei *R-SNAREs* meist als *v-SNAREs* und *Q-SNAREs* meist als *t-SNAREs* agieren (Hong 2005).

Unterschiedliche *t-SNAREs* können mit unterschiedlichen *v-SNAREs* interagieren. Aus welchen SNARE-Proteinen sich ein Komplex jedoch letztendlich zusammensetzt, ist stark abhängig vom Zelltyp und dem betroffenen Zellorganell und bisher noch nicht für alle Zellen und SNAREs bekannt (Hong 2005; Cai et al. 2007).

Als Beispiel sei die Verschmelzung synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran genannt (Abb. 3). Hierbei interagiert das *v-SNARE* Synaptobrevin, auch als vesikel-assoziiertes Membranprotein 2 (VAMP2) bezeichnet, mit den beiden *t-SNAREs* Syntaxin-1 und SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*), indem sich die Helices verdrillen und die Membranen so in räumliche Nähe zueinander bringen (Fasshauer 2003; Bonifacino und Glick 2004).

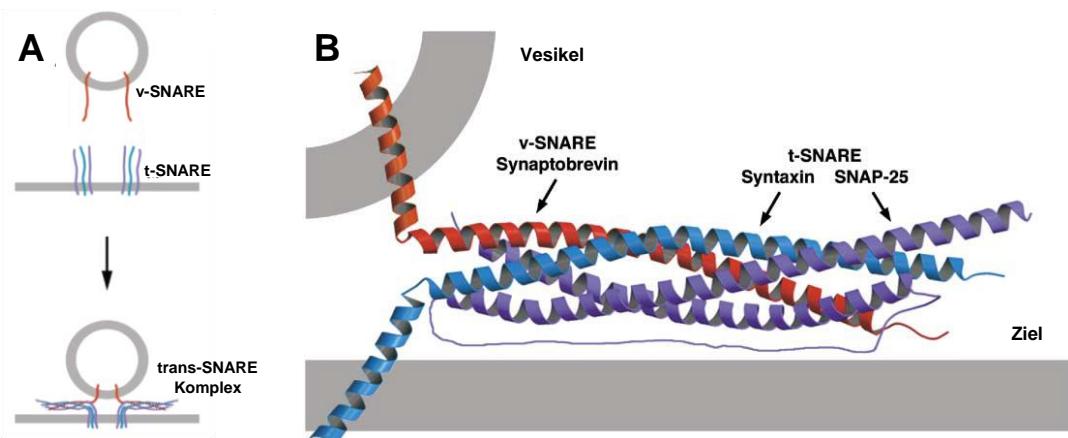


Abbildung 3: Der SNARE-Komplex synaptischer Vesikel. (A) *v-SNARE* (rot) und *t-SNAREs* (blau, lila) bilden gemeinsam einen *trans-SNARE-Komplex*; (B) Synaptischer *trans-SNARE-Komplex* als Kristallstruktur (adaptiert nach Bonifacino und Glick 2004).

Die vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMPs) VAMP1 bis VAMP8 sind *v-SNAREs* und somit ein wichtiger Bestandteil dieser zellulären Transportprozesse. Sie gehören der Synaptobrevin-Familie an und sind phylogenetisch eng verwandt. Alle VAMPs sind kleine

Proteine mit einer Molekülmasse zwischen ca. 11,5 kDa und 25 kDa (Tab. 1). Auch strukturell haben die VAMPs große Ähnlichkeit: Neben einer kurzen vesikulären Domäne und einer 20 - 21 Aminosäuren langen helikalen Transmembrandomäne ist die N-terminale zytoplasmatische Domäne 72 - 96 Aminosäuren (Ausnahmen: 118 Aminosäuren bei VAMP4, 187 Aminosäuren bei VAMP7) lang (UniProt Consortium 2017). Über die wichtige *v-SNARE coiled-coil homology domain*, die Teil der zytoplasmatischen Domäne ist, können sie die zuvor erläuterten SNARE-Komplexe mit den *t-SNAREs* bilden (Rossi et al. 2004). Bezuglich Gliazellen ist bekannt, dass Astrozyten Komponenten des SNARE-Komplexes exprimieren. Es konnte die Expression von VAMP2 und VAMP3 nachgewiesen werden (Schubert et al. 2011).

Tabelle 1: Vesikel-assoziierte Membranproteine in der Maus (AS: Aminosäuren; UniProt Consortium 2017)

Proteinname	Alternativname	Genname	AS	Molekülmasse in kDa
Vesicle-associated membrane protein 1	Synaptobrevin-1	Vamp1, Syb1	118	12,89
Vesicle-associated membrane protein 2	Synaptobrevin-2	Vamp2, Syb2	116	12,69
Vesicle-associated membrane protein 3	Synaptobrevin-3, Cellubrevin	Vamp3, Syb3	103	11,48
Vesicle-associated membrane protein 4		Vamp4	141	16,35
Vesicle-associated membrane protein 5	Myobrevin	Vamp5	102	11,42
Vesicle-associated membrane protein 7	Synaptobrevin-like protein 1, TI-VAMP	Vamp7, Syb11	220	24,97
Vesicle-associated membrane protein 8	Endobrevin	Vamp8	101	11,45

Einige Vorversuche meiner Arbeitsgruppe behandelten die VAMP-Expression in Müllerzellen (Hauser 2014). Immunfluoreszenzfärbungen zur Zelltyp-spezifischen Expression auf Proteinebene konnten VAMP3, VAMP5 und VAMP8 in Müllerzellen nachweisen. Western Blot-Versuche wiesen außerdem darauf hin, dass VAMP3 und VAMP8 vornehmlich in Müllerzellen zu finden sind, jedoch VAMP2 und VAMP4 primär neuronal exprimiert werden (Hauser 2014). Western Blot-Daten zu VAMP1, VAMP5 und VAMP7 konnten bisher nicht etabliert werden. In Versuchen mittels quantitativer Realtime PCR (qPCR) zeigte sich, dass VAMP2 in Müllerzellen weniger stark exprimiert wurde als in den übrigen Zelltypen. Im Gegensatz dazu wurden VAMP3 und VAMP7 von Müllerzellen stärker exprimiert, VAMP5 schien ausschließlich in Müllerzellen exprimiert zu werden (Hauser 2014). Aussagen zu VAMP1, VAMP4 und VAMP8 mittels qPCR konnten bisher nicht getroffen werden.

Um die VAMPs der Retina näher zu erforschen, eignen sich insbesondere auch Versuche in transgenen Mausmodellen, die auch in dieser Arbeit zum Einsatz kommen sollten (Kapitel 3.3).

Eine Möglichkeit sind VAMP7-Knockout-Mäuse, in denen das Exon 3 von VAMP7 deletiert wurde (Danglot et al. 2012). VAMP7 scheint eine Rolle bei der Axonextension in Neuronen (Sato et al. 2011), der Exozytose aus sekretorischen Lysosomen in Astrozyten (Verderio et al. 2012) sowie der Homöostase des Golgi-Apparats (Molino et al. 2015) zu spielen. Außerdem ist es vermutlich in sekretorische und endozytotische Signalwege involviert, die Neuritenwachstum, synaptische Transmission und Plasmamembranremodeling vermitteln (Chaineau et al. 2009). Passend dazu führte in Studien der Knockout von VAMP7 zu einem reduzierten Hirngewicht und einem vergrößerten Volumen des dritten Hirnventrikels sowie einer gesteigerten Angstanwort der Tiere (Danglot et al. 2012). Abgesehen davon wurden für den VAMP7-Knockout keine weiteren neurologischen oder Entwicklungsdefekte beschrieben, sodass vermutet werden konnte, dass kompensatorische Mechanismen für die wichtigsten Entwicklungsschritte vorlagen (Danglot et al. 2012). Daten zur Veränderung der Netzhaut in diesen Tieren fehlen bisher.

Ein weiteres interessantes transgenes Mausmodell zur Erforschung der VAMPs in der Retina, insbesondere den Müllerzellen, ist die iBot-Maus. In dieser ist Müllerzell-spezifisch die Funktion von VAMP1-3 durch Expression von Botulinumtoxin (BoNT) unter Kontrolle des Glia-spezifischen Glast-Promotors unterbunden. Die das Transgen exprimierenden Müllerzellen zeigten in Studien eine verminderte Glutamatfreisetzung sowie eine stark eingeschränkte Volumenregulation und Kommunikation mit Nervenzellen (Slezak et al. 2012). Die ATP-Freisetzung war nicht beeinträchtigt (Slezak et al. 2012; Wagner et al. 2017). Wider Erwarten konnten jedoch keine morphologischen oder funktionellen Veränderungen in Bezug auf die neuronale Informationsweitergabe in der iBot-Netzhaut festgestellt werden (Slezak et al. 2012).

1.3.2 Vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUTs)

Nach der vesikulären Glutamatsekretion muss der extrazelluläre Transmitter wieder in die Zellen aufgenommen werden, z. B. mittels sich in der glialen oder präsynaptischen Membran befindlichen Transportern. Vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUTs) sind für diese Wiederaufnahme und das Speichern von Glutamat in intrazellulären Vesikeln zuständig (Parpura und Zorec 2010; Kapitel 1.3, Abb. 2). Bisher sind drei verschiedene VGLUTs bekannt (VGLUT1-3) und es gibt verschiedene Studien, welche die Expression aller drei Subtypen in Zellen des ZNS demonstrierten (Johnson et al. 2003; Haverkamp und Wässle 2004; Stella et al. 2008).

In der Retina ist VGLUT1 nach aktuellem Forschungsstand in präsynaptischen Nervenenden der IPS und ÄPS (Kapitel 1.1, Abb. 1) zu finden (Johnson et al. 2003), er zeigte in der ischämischen Retina keine signifikante Expressionsänderung (Michalski et al. 2013). VGLUT2 ist in der Netzhaut nur gering in den synaptischen Endigungen von Photorezeptoren in der ÄPS exprimiert (Wässle et al. 2006). Auch hier fand sich im ischämischen Retinamodell keine Expressionsänderung im Vergleich zur gesunden Retina (Michalski et al. 2013). Für VGLUT3 wurde bisher eine Expression in Amakrinzellen beschrieben (Haverkamp und Wässle 2004; Michalski et al. 2013), welche allerdings in der ischämischen Retina, im Gegensatz zum ischämischen Neocortex, sehr sensitiv auf ischämische Schäden reagierte (Michalski et al. 2013).

In den mit Müllerzellen vergleichbaren Astrozyten konnten alle drei Isoformen der VGLUTs nachgewiesen werden (Montana et al. 2006; Parpura und Zorec 2010; Schubert et al. 2011). VGLUT3 allerdings scheint eine Schlüsselrolle in der Kalzium-abhängigen Glutamatsekretion durch Astrozyten, der bereits angesprochenen Gliotransmission, zu spielen: Er ist im Gegensatz zu VGLUT1 und VGLUT2 der einzige Transporter seiner Gruppe, der in Astrozyten bei Überexpression die Kalzium-abhängige Glutamatsekretion erhöhte (Ni und Parpura 2009).

Bisher ist nicht bekannt, ob VGLUTs auch in Müllerzellen zu finden sind und so zur Gliotransmission in Müllerzellen beitragen könnten, was in meiner Arbeit beantwortet werden sollte (Kapitel 3.2.1).

1.3.3 Exosomen

Eine weitere bereits angesprochene molekulare Komponente vesikulärer Sekretion sind die Exosomen. Exosomen sind kleine Membranvesikel mit einem Durchmesser von ca. 30 - 200 nm, die von der Zelle nach extrazellulär sezerniert werden (Pegtel und Gould 2019). Hiermit sind Exosomen als sekretorische Vesikel gemeint. Diese müssen vom als „Exosom“ bezeichneten Ribonukleasekomplex unterschieden werden, der für den Abbau nukleärer RNAs verantwortlich ist (Mitchell et al. 1997). Eine Vielzahl von Zellen sezernieren Exosomen, und zwar neben hämatopoetischen Zellen wie B-Lymphozyten, T-Zellen (Mignot et al. 2006) und Makrophagen (Schorey und Bhatnagar 2008) unter anderem auch Epithelzellen (Mignot et al. 2006), Astrozyten, Neuronen (Fauré et al. 2006), Tumorzellen und weitere (Mignot et al. 2006; Li et al. 2017). Aber auch in den meisten Körperflüssigkeiten wie z. B. in Urin, Fruchtwasser, Speichel und Liquor finden sie sich (Li et al. 2017). In vitro werden Exosomen entweder spontan bzw. konstitutiv sezerniert, wie das z. B. bei Makrophagen der

Fall ist (Bhatnagar und Schorey 2007), oder nach vorangegangener Induzierung wie z. B. bei T- (Blanchard et al. 2002) oder ruhenden B-Zellen (Saunderson et al. 2008).

Exosomen können einerseits vermutlich direkten Ausstülpungen aus der Plasmamembran entstammen (Shen et al. 2011; Nager et al. 2017; Pegtel und Gould 2019). Andererseits können sie im Gegensatz zu anderen sezernierten Membranvesikeln, wie z. B. Mikrovesikeln, auch aus internen Vesikeln der sogenannten multivesikulären Körperchen entstehen. Aus diesen werden sie freigesetzt, indem die Membran der multivesikulären Körperchen mit der Plasmamembran fusioniert (Février und Raposo 2004; Abb. 4). An der Fusion sind vermutlich auch die Membranproteine Synaptotagmin und Rab sowie die oben beschriebenen Proteine des SNARE-Komplexes beteiligt und sie findet ebenfalls Kalzium-abhängig statt (Reddy et al. 2001; Savina et al. 2002; Savina et al. 2003; Fauré et al. 2006). Der Transport der multivesikulären Körper in die Zellperipherie ist Mikrotubuli- und Kinesin-abhängig (Wubbolts et al. 1999; Denzer et al. 2000; van Niel et al. 2006).

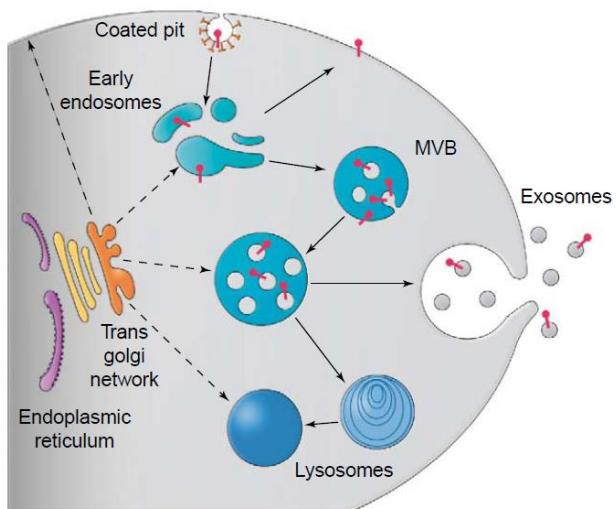


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biogenese von Exosomen. Durch Fusion entstehen endosomale Vesikel, nachdem Membranproteine entweder von der Zelloberfläche über endozytische Vesikel (sog. Coated Pits) oder aus dem endoplasmatischen Retikulum über das Trans-Golgi-Netzwerk zugeführt werden. Durch Einstülpung der Endosomenmembran bilden sich dann intraluminale Vesikel, die jeweils die eingesortierten Proteine enthalten. Durch immer weitere Einstülpungen entstehen multivesikuläre Körper (sog. multivesicular bodies, abgekürzt MVB). Aus diesen werden dann bei Fusionierung mit der Plasmamembran die Vesikel als Exosomen freigesetzt. Entwickelt sich das Endosom jedoch nicht zum MVB, sondern alternativ zu einem Lysosom, degradieren die darin enthaltenen Proteine (Février und Raposo 2004).

Die genauen Ziele und Funktionen von Exosomen sind noch teilweise unbekannt (Arenaccio und Federico 2017; Aheget et al. 2020; Liu et al. 2020; Rastogi et al. 2021). Entsprechend ihres Ursprungs können sie verschiedenste Rollen bei physiologischen (Abb. 5) und pathologischen Prozessen spielen:

Bestimmte Zellen, z.B. heranreifende Retikulozyten, scheinen mithilfe von Exosomen nicht mehr benötigte Proteine auszuschleusen (Stoorvogel et al. 2002). Weiterhin sind Exosomen wohl am Entwicklungsprozess von Geweben beteiligt (Stoorvogel et al. 2002). Entsprechend ihrer Biogenese aus multivesikulären Körpern könnte ihre Erforschung außerdem genauere Erkenntnisse über die Protein- und Lipidsortierung in Endosomen geben (Denzer et al. 2000;

Hessvik und Llorente 2018). Exosomen haben wichtige immunregulatorische Aufgaben, z. B. möglicherweise im Rahmen erworbener Immunität, und könnten deshalb als zellfreies Vehikel ein attraktives immunotherapeutisches Werkzeug werden (Denzer et al. 2000; Hough et al. 2017; Lu et al. 2018; Wei et al. 2019). Beispielsweise sezernieren Antigen-präsentierende Zellen wie B-Lymphozyten MHC-tragende (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) Exosomen, die *in vitro* die T-Zell-Proliferation stimulierten (Stoorvogel et al. 2002).

Vor allem aber spielen sie eine Schlüsselrolle in der interzellulären Kommunikation und reflektieren den Phänotyp der Herkunftszelle (Li et al. 2017). Interzelluläre Kommunikation, die durch Exosomen vermittelt ist, beeinflusst nicht nur die Regulation physiologischer, sondern auch die pathologischer Prozesse und somit von Krankheiten wie z. B. Karzinomen, Autoimmunerkrankungen, Diabetes, kardiovaskulären oder neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer (Dai et al. 2008; Li et al. 2017; Abak et al. 2018; Zhang et al. 2019; Rastogi et al. 2021). Interessanterweise werden auch einige ophthalmologische Erkrankungen mit Exosomen in Verbindung gebracht, z.B. okuläre Tumore, die diabetische Retinopathie oder die altersbedingte Makuladegeneration, und die Vielzahl der aktuell hierzu erscheinenden Studien unterstreicht die gegenwärtige Relevanz dieses Themas (Li et al. 2019c; Liu et al. 2020; Lande et al. 2020; Li et al. 2020; Jiang et al. 2020; Han et al. 2021).

Für viele der oben genannten Erkrankungen haben einige Studien bereits sowohl das diagnostische Potential von Exosomen, z. B. in Form von Biomarkern, als auch ihr therapeutisches Potential gezeigt (Cunha et al. 2016; Joyce et al. 2016; Lawson et al. 2016; Selmaj et al. 2017; Li et al. 2019b; Counil und Krantic 2020; Pascual et al. 2020; Upadhyay et al. 2020; Rastogi et al. 2021). In Bezug auf die Therapie ophthalmologischer Erkrankungen beispielsweise gibt es bereits vielversprechende Ansätze zur Nutzung von Exosomen (Klingeborn et al. 2017; Mead und Tomarev 2020; Ma et al. 2020; Nuzzi et al. 2020), etwa mittels therapeutischer intravitraler Injektion von aus mesenchymalen Stammzellen stammenden Exosomen (Harrell et al. 2018). Auch der Einsatz von mit Medikamenten beladenen Exosomen wäre beispielsweise denkbar (Li et al. 2019c). Die Forschung an Exosomen ist folglich auch deshalb über die Grundlagenforschung hinaus von höchster klinischer Bedeutung.

Neuere Studien zeigten, dass auch Gliazellen Exosomen sezernieren, sogenannte *glia-derived exosomes* (GDE). Diese können mit Neuronen kommunizieren und so eine Rolle in der Neuron-

Glia-Signaltransduktion spielen (Li et al. 2019b). Die sich im ZNS befindlichen Gliazellen Oligodendrozyten beispielsweise beeinflussen die neuronale Signalweitergabe und Genregulation durch Glutamat-abhängige, Kalziumeinstrom-vermittelte Sekretion von Exosomen (Frühbeis et al. 2013; Fröhlich et al. 2014). Auch aus Astrozyten werden Exosomen mittels regulierter Exozytose freigesetzt (Verkhratsky et al. 2016). Einige Studien konnten GDE bereits im Tiermodell ein vielversprechendes therapeutisches Potential zuschreiben (Huang et al. 2018; Hira et al. 2018; Li et al. 2019b).

Aus proteomischen Daten von Müllerzellen weiß man, dass in diesen viele Proteine zu finden sind, die Bezug zu extrazellulären vesikulären Exosomen haben (Grosche et al. 2016). Bisher ließen sich Exosomen jedoch noch nie in Müllerzellen nachweisen. Ob sie in Müllerzellen zu finden sind und so eine Grundlage von Gliotransmission in Müllerzellen darstellen könnten, sollte in dieser Arbeit erforscht werden (Kapitel 3.2.3).

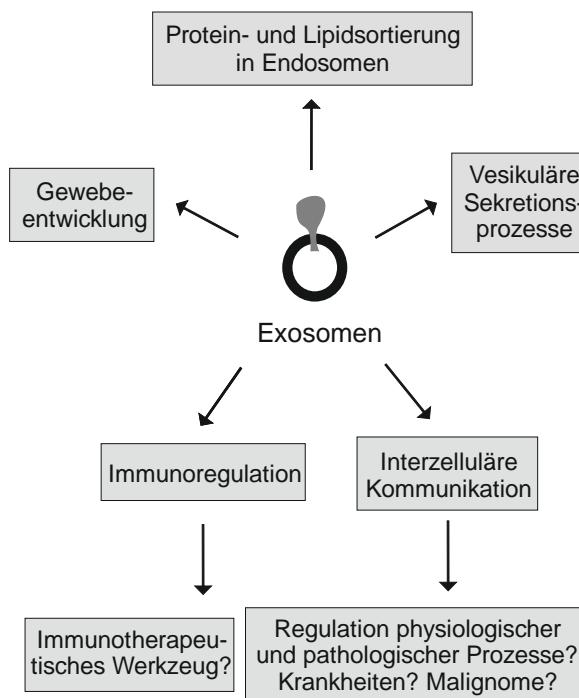


Abbildung 5: Ausgewählte Funktionen von Exosomen und einzelne Forschungsansätze (Denzer et al. 2000; Stoovogel et al. 2002; Frühbeis et al. 2013; Fröhlich et al. 2014; Verkhratsky et al. 2016; Hough et al. 2017; Li et al. 2017; Hessvik und Llorente 2018; Lu et al. 2018; Wei et al. 2019; Li et al. 2019b; Li et al. 2020; Han et al. 2021).

1.4 Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Ausnahmestellung der Müllerzelle und ihr großes Potential bei der Regulation retinaler Funktionen liegen auf der Hand und sind Gegenstand aktueller Forschung. Besonders herauszustellen ist ihr enger Informationsaustausch mit praktisch allen anderen Zelltypen der Netzhaut. Ein zentraler Kommunikationsweg – die Freisetzung von Botenstoffen via Vesikeln – stellte den Hauptfokus meiner Dissertation dar und dessen Erforschung sollte einen wichtigen Beitrag leisten, diese Form der Zell-Zell-Interaktion in der Retina besser zu verstehen.

Um exakte Experimente mit Müllerzellen durchführen zu können, war zunächst bei ihrer Isolation aus der Netzhaut eine möglichst hohe Reinheit wichtig. Hierfür wurde ein bereits durch meine Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll zur Isolation von Müllerzellen aus der Mausretina weiterentwickelt und die erzielte Reinheit mittels histologischer und TaqMan®-PCR-Untersuchungen getestet (Kapitel 3.1). Gleichzeitig konnten so auch einige Aussagen über die bereits angesprochenen, mithilfe des Isolationsprotokolls ebenfalls aus der Retina isolierten Mikrogliazellen, Endothelzellen und Neuronen getroffen werden.

Im Anschluss lag der Fokus auf der Müllerzelle in ihrer Rolle als Gliazelle. Es sollte die Frage erörtert werden, ob sie zur viel diskutierten Gliotransmission fähig ist. Hierfür wurde untersucht, ob die Müllerzelle prinzipiell über ausgewählte molekulare Grundlagen zur exozytotischen Sekretion verfügt (Kapitel 3.2). Diese bestehen unter anderem in der Existenz von VGLUTs, VAMPs und Exosomen, welche bereits näher beleuchtet wurden (Kapitel 1.3). Da die Müllerzelle auch als Modell-Glia gesehen werden kann, könnten sich Erkenntnisse dieser Arbeit möglicherweise auch auf Gliazellen in anderen Abschnitten des Nervensystems übertragen lassen. Davon abgesehen wurden auf diese Weise auch die VAMPs, VGLUTs und Exosomen an sich näher erforscht.

Im letzten Schritt sollte mittels histologischer, Protein- und TaqMan®-Analysen untersucht werden, welche Auswirkungen die Eliminierung eines Teils der genannten Exozytose-Grundlagen auf die Zellen der Retina, insbesondere die Müllerzellen, hatte (Kapitel 3.3). Hierfür wurden zum einen – unseres Wissens nach erstmals – Müllerzellen der anfangs beschriebenen VAMP7-Knockout-Mäuse analysiert (Kapitel 1.3.1). Zum anderen erfolgte die Untersuchung von Retinae transgener Mäuse, bei denen, wie zuvor dargelegt, Müllerzell-spezifisch die Funktion von VAMP1-3 durch Expression von Botulinumtoxin unterbunden wurde (iBot-Maus, Kapitel 1.3.1). Abschließend wurden erstmals neu von der AG Grosche generierte triple-transgene Tiere (iBot x VAMP7-Knockout) analysiert, die aus Verpaarungen der beiden beschriebenen Mauslinien hervorgingen. Ziel war es hier, darzustellen, welchen Einfluss das Fehlen eines ganzen Sets an VAMP-Proteinen (funktionell VAMP1-3 in Müllerzellen, VAMP7) auf die Integrität der Netzhaut hatte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Sowohl männliche als auch weibliche 2 - 6 Monate alte Tiere wurden untersucht. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter ad libitum unter strenger Einhaltung des Zwölf-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus in klimatisierten Räumen. Sämtliche Versuche wurden gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Als Wildtypen wurden C57Bl/6J-Mäuse verwendet. Alle transgenen Mauslinien wurden vom Kollaborationspartner Dr. Frank Pfrieger (INSERM, Straßburg) bereitgestellt und zeigten keine Entwicklungsstörungen (Tab. 2).

Tabelle 2: In meiner Doktorarbeit verwendete Mauslinien

Mausstamm	Institut	Originalveröffentlichung	Linie/Transgen	MGI-Nr.
Wildtyp	Tierhaltung Uniklinikum Regensburg		C57Bl/6J	3028467
VAMP7-Knockout	Institut Clinique de la Souris ICS, Illkirch, Frankreich	(Danglot et al. 2012)	129S2/SvPas	5313432
CreER^{T2}	IGBMC, Illkirch, Frankreich	(Slezak et al. 2007)	Tg(Clcl1a3-cre/ERT2)45-72Fwp	4420274
BoNT/B	Jackson Laboratories	(Slezak et al. 2012)	Tg(CAG-boNT/B,-EGFP)U75-56Fwp	5318975

Als transgene Mauslinien wurden VAMP7-Knockout-, CreER^{T2}- und BoNT/B-Mäuse verwendet. Dabei werden im Folgenden die bigenen Tiere (CreER^{T2} x iBot-Transgen), in denen funktionell VAMP1-3 in Müllerzellen ausgeknockt wurden, als iBot-Tiere bezeichnet. Als triple-transgen werden die Mäuse betitelt, in denen vor einem VAMP7-defizienten Hintergrund Müllerzell-spezifisch VAMP1-3 funktionell eliminiert wurden (iBot x VAMP7-KO bzw. CreER^{T2} x iBot-Transgen x VAMP7-KO).

Liegen sowohl das CreER^{T2}- als auch das iBot-Transgen in einem Tier vor, so führt eine Tamoxifeninjektion auf Grund des Glia-spezifischen Glast-Promotors zur Expression der Cre-Rekombinase in Müllerzellen. Dies hat wiederum eine Rekombination im iBot-Transgen durch die Cre-Rekombinase zur Folge, wodurch die Expression der leichten Kette von Botulinumtoxin Serotyp B (BoNT/B) ausschließlich in Müllerzellen vermittelt wird (Slezak et al. 2012; Abb. 6). Die proteolytische Aktivität dieses bakteriellen Proteins spaltet nur VAMP1, VAMP2 und VAMP3 (Schiavo et al. 1992; Humeau et al. 2000) und blockiert so die

VAMP1-3-abhängige Exozytose (Slezak et al. 2012). Diese bigenen Tiere wurden zusätzlich mit VAMP7-Knockout-Tieren (Danglot et al. 2012) gepaart, um auf einem VAMP1-3-defizienten Hintergrund zusätzlich VAMP7 auszuknocken und somit triple-transgene Genotypen zu generieren. Die Zucht erfolgte teilweise durch den Kollaborationspartner Dr. Frank Pfrieger (INSERM, Straßburg), teilweise in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Regensburg.

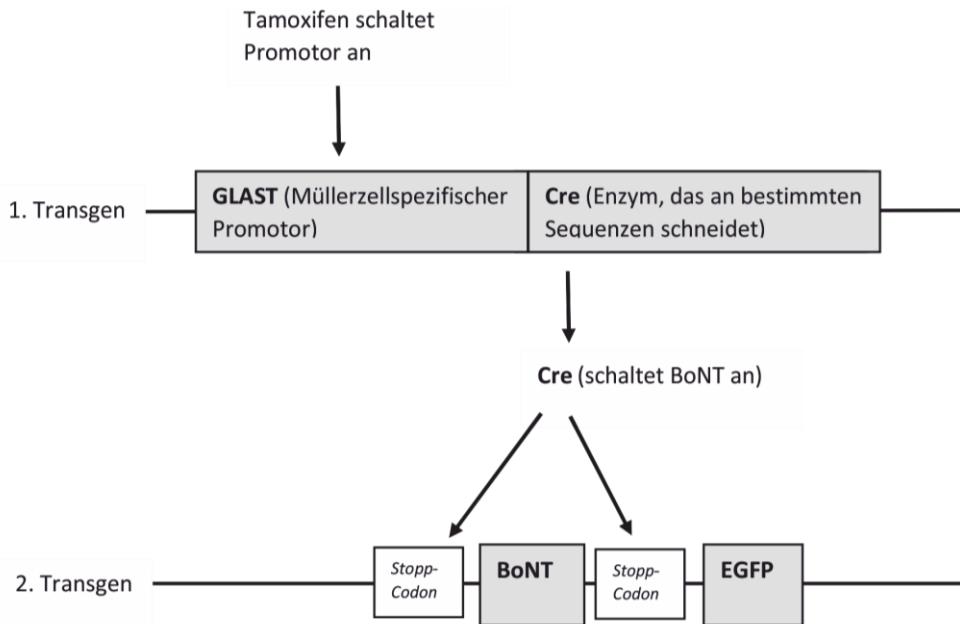


Abbildung 6: iBot-Mausmodell zur Müllerzell-spezifischen Expression von BoNT (CreER^{T2} x iBot-Transgen). Expression der leichten Kette von Botulinumtoxin Serotyp B (BoNT) ausschließlich in Müllerzellen mittels Rekombination im iBot-Transgen durch die Cre-Rekombinase, die in Müllerzellen nach Tamoxifeninjektion auf Grund des Glia-spezifischen Glast-Promotors exprimiert ist.

Alle Linien hatten einen ähnlichen genetischen Hintergrund, da sie regelmäßig mit der C57Bl/6J-Linie rückgekreuzt wurden. Als Kontrollen dienten jeweils monogene VAMP7-Knockout-Mäuse, die VAMP1-3 noch exprimierten. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR von aus Schwanzbiopsien isolierter DNA (Kapitel 2.2.1). Die Induktion der Cre-Rekombinase-Aktivität, also der induzierte Knockout von VAMP1-3 in GlastCreER^{T2} x iBot-Transgen-positiven Mäusen, erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von Tamoxifen. Hierfür wurde Mäusen im Alter von 4 - 6 Wochen jeweils 2 mg Tamoxifen für 5 konsekutive Tage injiziert (Slezak et al. 2012), was teilweise durch den Kollaborationspartner, teilweise durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Dabei wurden Tamoxifen-injizierte VAMP7-KO-Tiere, die entweder das GlastCreER^{T2}- oder das iBot-Transgen trugen, als Kontrolle verwendet. Die Tiere wurden frühestens 2 - 3 Wochen nach Injektion weiteren Analysen zugeführt.

2.1.2 Stocklösungen

5x Extrazellulärlösung (EZL)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
NaCl	58,44 g/mol	39,74 g
KCl	74,56 g/mol	1,12 g
MgCl₂	203,30 g/mol	1,00 g
2-Ethansulfonsäure (HEPES)	238,31 g/mol	11,91 g
CaCl	147,02 g/mol	1,7 g
Glucose-Monohydrat	198,17 g/mol	2,18 g
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)		Ad 1.000 ml

10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
NaCl	58,44 g/mol	80,0 g
KCl	74,56 g/mol	2,0 g
Na₂HPO₄ x 2H₂O	177,99 g/mol	14,4 g
KH₂PO₄	136,09 g/mol	2,4 g
Aqua dest.		Ad 1.000 ml

10x Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
TRIS	121,14 g/mol	108 g
Borsäure	61,83 g/mol	55 g
Na₂EDTA	372,24 g/mol	7 g
Aqua dest.		Ad 1.000 ml

10x Natriumdodecylsulfat-Puffer (SDS-Puffer)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
TRIS	121,14 g/mol	30,3g
Glycin	75,07 g/mol	144,1 g
SDS	288,37 g/mol	10 g
Aqua dest.		Ad 1.000 ml

10x Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung (TBS-Puffer)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
TRIS	121,14 g/mol	60,5 g
NaCl	58,44 g/mol	87,5 g
Aqua dest.		Ad 1.000 ml

Tris und NaCl wurden in 800 ml Aqua dest. gelöst und der pH 7,6 mit 1M HCl eingestellt.

Danach wurde das Volumen auf 1.000ml aufgefüllt.

1x TBS für Immunpräzipitation

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
TRIS	121,14 g/mol	180g
NaCl	58,44 g/mol	440g
Aqua dest.		Ad 5.000ml

Tris und NaCl wurden in 4500 ml Aqua dest. gelöst und der pH 7,4 mit 1M HCl eingestellt.

Danach wurde das Volumen auf 5.000ml aufgefüllt.

10x Towbin-Puffer

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
TRIS	121,14 g/mol	60,57 g
Glycin	75,07 g/mol	288,23 g
Aqua dest.		Ad 2.000 ml

1x Towbin-Puffer

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
10x Towbin-Stocklösung		100 ml
Methanol	32,04 g/mol	200 ml
Aqua dest.		Ad 1.000 ml

2.1.3 Gebrauchsfertige Lösungen

10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
APS	228,18 g/mol	5 g
Aqua dest.		Ad 50 ml

Die Lagerung erfolgte aliquotiert bei -20 °C, die Verwendung bei 4 °C.

1x EZL

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
5x EZL Stocklösung		10 ml
Aqua dest.		40 ml

Direkt vor der Verwendung wurde mit TRIS ein pH von 7,4 eingestellt

100x Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
PMSF	174,19 g/mol	0,174 g
In Dimethylsulfoxid (DMSO)	78,13 g/mol	10 ml

Radioimmunpräzipitations-Puffer (RIPA-Puffer)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
Nonidet P-40	600 g/mol	10 ml
Na-Deoxycholat	414,57 g/mol	2,5 ml
EDTA	292,24 g/mol	1 ml
TRIS	121,14 g/mol	790 mg
NaCl	58,44 g/mol	900 mg
Aqua dest.		Ad 100 ml

Gebrauchsfertiger RIPA-Puffer

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	174,19 g/mol	173 µl
RIPA		Ad 10 ml

Pro 10 ml gebrauchsfertigen RIPA-Puffers wurde 1 Tablette Complete Mini EDTA-freier Proteaseinhibitor™ hinzugegeben und aufgelöst.

1x PBS/Glucose (11mM)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
10x PBS Stocklösung		100 ml
Glucose-Monohydrat	198,17 g/mol	2,18 g
Aqua dest.		Ad 1.000 ml

4 % Paraformaldehyd

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
Paraformaldehyd	30,03 g/mol	40g
1x PBS	411,04 g/mol	Ad 1.000 ml

6x Ladepuffer (Westernblot)

Substanz	Molekulargewicht	Menge Total
TRIS-HCl		375 mM
SDS	288,37 g/mol	9 %
Glycerin	92,09 g/mol	50 %
β-Mercaptoethanol	78,13 g/mol	9 %
Bromphenolblau	669,96 g/mol	0,03 %

2.1.4 Kits

Name	Hersteller	Artikelnr.
exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D	77044
Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA	89842
PureLink™ PCR Micro Kit (Schwanzspitzen-PCR)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA	K310250
RC DC Protein Assay Reagents Package	BIO-RAD, Hercules CA, USA	500-0120
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA	K1631
RNeasy Micro Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D	74004
Total Exosome Isolation	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA	4478359

2.1.5 Enzyme

Name	Hersteller	Artikelnr.	Spezifische Aktivität
DNase I	Roche Diagnostics, Rotkreuz, CH	10104159001	200 U/ml
Papain	Roche Diagnostics, Rotkreuz, CH	11284932001	12 U/ml

2.1.6 Oligonukleotide

PCR-Primer (durch Metabion synthetisiert)

Gen		Sequenz
VAMP7	forward reverse	5'-CCC GCC AGA CGG TAC TCG GT-3' 5'-AGT TTG GTG GTT TCC ACC TTG GCA-3'
Cre	forward reverse	5'-ATT TGC CTG CAT TAC CGG TC-3' 5'-ATC AAC GTT TTG TTT TCG GA-3'
Tox	forward reverse	5'-CGT GTT CCA CTC GAA GAG TT-3' 5'-GGC AAA ACT TCA TTT GCA TT-3'

TaqMan-Primer

Gen		Sequenz	Amplikon	Sonden-Nr.
VAMP1	forward reverse	5'-ACG GAC CTC CAC TTC CTC TT-3' 5'-CAG CTC CTT CTG TCC CTT CA-3'	74 bp	78
VAMP2	forward reverse	5'-CCA AGC TCA AGC GCA AAT-3' 5'-GGG ATT TAA GTG CTG AAG TAA ACG-3'	112 bp	31
VAMP3	forward reverse	5'-TTG AAA CAA GTG CTG CCA AG-3' 5'-ATC CCT ATC GCC CAC ATC T-3'	70 bp	31

VAMP4	forward reverse	5'-TGC AAG AGA ATA TTA CAA AGG TAA TTG-3' 5'-GAA AGC GGT GGC ATT ATC C-3'	95 bp	91
VAMP5	forward reverse	5'-GAG TTG GAG CAG CGT TCA G-3' 5'-TGG GCT AAA GTC TTG GTT GTC-3'	74 bp	17
VAMP7	forward reverse	5'-GAC CTT CGC CCC TCA GTC-3' 5'-AGA ATG GCC ATG ACT TCA ATC T-3'	74 bp	78
VAMP8	forward reverse	5'-CCT CCG AAA CAA GAC AGA GG-3' 5'-GGA CAA TCA CAC AGA TGA CA-3'	125 bp	31
CD29	forward reverse	5'-CAC AAC AGC TGC TTC TAA AAT TG-3' 5'-TCC ATA AGG TAG AGA TCA ATA GGG-3'	103 bp	41
Glul	forward reverse	5'-GCC CAA GTG TGT GGA AGA G-3' 5'-AAG GGG TCT CGA AAC ATG G-3'	117 bp	58
Nrl	forward reverse	5'-TGC CTT TCT GGT TCT GAC AGT-3' 5'-GAA AGC CAT TCT GGG ACT GA-3'	93 bp	53
Rho	forward reverse	5'-TCT ATA ACC CGG TCA TCT ACA TCA T-3' 5'-GCT GGT CTC CGT CTT GGA-3'	131 bp	53
BoNT/B	forward reverse	5'-CTG GCC CAG GTC CAA ATA-3' 3'-CGT GTT CCA CTC GAA GAG TTT-5'	130 bp	2
Rlbp1	forward reverse	5'-AAG GGC TTC ACC ATG CAG-3' 5'-ACC TGG CTG GGA ATG AAT C-3'	91 bp	74
VGLUT1	forward reverse	5'-GCA ACG ACA GCC TTT TGC-3' 3'-CCG AAG CTG CCA TAG ACA TAG-5'	116 bp	58
VGLUT2	forward reverse	5'-TGG CTA CAA CCT TTT GTG-3' 3'-GGA TAC CAG CTA AGG GCA TTG-5'	66 bp	67
VGLUT3	forward reverse	5'-GTG CAT TAC GGC TGT GTC ATT-3' 3'-GCA GGC AGG GTA GGT CAC-5'	72 bp	22
CD11b	forward reverse	5'-GAC TCT CAT GCC TCC TTT GG-3' 5'-GTG GGT CCT GGA CAT GTT G-3'	78 bp	68
Icam2	forward reverse	5'-GCA CTC GGA GAG TCT CAA CA-3' 5'-GCTGCAGCTTCAGTGTGACT-3'	65 bp	75

Sonden

Sonden-Nr.	Artikelnr. (Roche Diagnostics, Penzberg, D)
2	04684982001
17	04686900001
22	04686969001
31	04687647001
41	04688007001
53	04688503001
58	04688554001
67	04688660001

68	04688678001
74	04688970001
75	04688988001
77	04689003001
78	04689011001
91	04692080001
95	04692128001
106	04692250001

2.1.7 Chemikalien

Name	Hersteller	Artikelnr.
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA	15240062
Protein-G-Beads (IP)	Zur Verfügung gestellt – Dr. Stefanie Hauck (Helmholtz Zentrum München)	
Kontroll-IgG rabbit (IP)	Zur Verfügung gestellt – Dr. Stefanie Hauck	
Kontroll-IgG mouse (IP)	Zur Verfügung gestellt – Dr. Stefanie Hauck	
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, D	840004
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D	8076.4
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A0834
Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	120-000-900
Borsäure	Merck Millipore, Darmstadt, D	1.00165
CaCl₂ • 6H₂O	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A4689
CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-049-601
CD31 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-097-418
Complete Mini EDTA-free Proteaseinhibitor Tbl.	Roche Diagnostics, Penzberg, D	04693159001
(D+)-Glucosemonohydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A3730
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Millipore, Darmstadt, D	1.02931
Ethanol	Avantor Performance Materials, Center Valley, USA	8006
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA	EDS-100G
Glutaraldehyd (für Exosomen-EM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D	3778.1
Goat Anti-Rat IgG MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	120-000-291
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A3724
KCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A2939
KH₂PO₄	Merck Millipore, Darmstadt, D	1.04873

MACS® NeuroBrew-21	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-093-566
MACS® Neuro Medium	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-093-570
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, D	1.060009
MgCl₂ • 6H₂O	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A4425
Midori Green	Biozym, Hessisch Oldendorf, D	617006
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D	T145.3
Na₂HPO₄ • 2H₂O	Merck Millipore, Darmstadt, D	1.066580
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A2942
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA	D6750
Nonidet P-40 (NP40)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A1694
Normal Donkey Serum	Abcam, Cambridge, UK	ab7481
Normal Goat Serum	Abcam, Cambridge, UK	ab7475
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A3813
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA	P7626
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards	BIO-RAD, Hercules CA, USA	161-0377
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI	Life Technologies, Eugene OR, USA	P36935
ProtoGel® Stacking Buffer	National diagnostics, Atlanta GA, USA	EC-893
RNaseZap®	Life Technologies, Eugene OR, USA	AM9782
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D	2367.1
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A1086
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A4975
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt, D	A1389
ULTRA PURE ProtoGel®	National diagnostics, Atlanta GA, USA	EC-890
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)	Merck Millipore, Darmstadt, D	1.07209
β-Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D	8.05740
WesternSure® PREMIUM Chemiluminescent Substrate	LI-COR Biotechnology, Lincoln NE, USA	92695000

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Host	Hersteller	Artikelnr.
α-Calretinin	goat	Swant, Marly 1, CH	6B3

α-CD29	mouse	Beckton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA	610468
α-CRALBP	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA	sc-28193
α-GFAP	mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA	G3893
α-Glutaminsynthetase	mouse	Merck Millipore, Darmstadt, D	MAB302
α-Iba1	rabbit	Wako, Osaka, JP	019-19741
α-RLPB1	rabbit	Proteintech Group, Chicago IL, USA	15356-1-AP
α-VAMP1	rabbit	Synaptic Systems, Göttingen, D	104 002
α-VAMP3	rabbit	Synaptic Systems, Göttingen, D	104 103
α-VAMP5	rabbit	Synaptic Systems, Göttingen, D	176 003
α-VAMP7	mouse	Synaptic Systems, Göttingen, D	232 011
α-CD63	rabbit	BioCat, Heidelberg, D	EXOAB-CD63A-1-SBI
α-CD9	rabbit	BioCat, Heidelberg, D	EXOAB-CD9A-1-SBI
α-beta-Aktin	mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA	A5316

Sekundäre Antikörper

Name	Host	Hersteller	Artikelnr.
α-goat Cy3	donkey	Jackson IR	705-165-147
α-mouse Cy2	donkey	Jackson IR	715-225-150
α-rabbit Cy3	donkey	Jackson IR	711-165-152
α-rabbit Cy5	donkey	Jackson IR	711-175-152
α-mouse Alexa Fluor® 488	goat	Life Technologies, Eugene OR, USA	A28175
α-Rabbit IgG, H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate (Western Blot)	goat	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, D	401315
α-Mouse IgG, H & L Chain Specific Peroxidase Conjugate (Western Blot)	goat	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, D	401215
α-Rabbit IgG HRP (CD63-Western Blot)	goat	BioCat, Heidelberg, D	EXOAB-CD63A-1-SBI

2.1.9 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller	Artikelnr.
24 well Zellkulturplatte	Corning Inc., Corning NY, USA	3527
96 well ELISA Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D	655 101
Agfa Cronex 5 Röntgenfilm	A. Hartenstein, Würzburg, D	RF01
BD Microlance™ 3 30G	Beckton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA	304000
BD Microlance™ 3 Nr. 16, 23G	Beckton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA	300800
BD Microlance™ 3 Nr. 20, 27G	Beckton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA	302200
BD Plastipak™ Spritze 1 ml	Beckton Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA	300013
Cellstar® Tubes, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D	188 271
Cellstar® Tubes, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D	227 261
Combitips Advanced® 0,1 ml, Eppendorf Quality™	Eppendorf AG, Hamburg, D	0030 089.405
Combitips Advanced® 1,0 ml, Eppendorf Quality™	Eppendorf AG, Hamburg, D	0030 089.430
Combitips Advanced® 5,0 ml, Eppendorf Quality™	Eppendorf AG, Hamburg, D	0030 089.456
Cryomold®-Einbettsschälchen M, 15x15x5 mm	Sakura Finetek, Torrance CA, USA	4566
Deckgläser 24x50 mm	VWR, Darmstadt, D	631-1574
Deckgläser Ø 24 mm	VWR, Darmstadt, D	631-1583
Eppendorf Tubes® 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D	0030 119.460
Immobilion®-P Transfer Membrane	Merck Millipore, Darmstadt, D	IPVH00010
MACS® Separation Columns Large Cell Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	130-042-202
MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad CA, USA	4309849
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad CA, USA	4311971
Objektträger POLYSINET™	VWR, Darmstadt, D	663-0107
ParafilmR „M“	VWR, Darmstadt, D	291-1212
Pasteurpipetten 150 mm	VWR, Darmstadt, D	612-101
Pipettenspitzen Graduiert 100-1250 µl	VWR, Darmstadt, D	613 -1062
Pipettenspitzen Mikro 1-200µl	VWR, Darmstadt, D	613-1066
Pipettenspitzen Mikro, graduiert 0,1-10µl	VWR, Darmstadt, D	613-1068
Pipettenspitzen, Matrix™ 30µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA	7431
Probenrörchen 0,5 ml DNA-, DNase, - RNasefrei	Biozym, Hessisch Oldendorf, D	710690
Reagiergefäß 0,5 ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, D	72.699
Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht, D	72.706.400
Reagiergefäß 2,0 ml SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht, D	72.695.400

SafeSeal Tips Filterspitzen, 10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, D	770020
SafeSeal Tips Filterspitzen, 100 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, D	770100
SafeSeal Tips Filterspitzen, 1250 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, D	770600
Schraubverschlüsse mit Dichtring DNA-, DNase-, RNasefrei	Biozym, Hessisch Oldendorf, D	710716
Serologische Pipette, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D	86.1254.001
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt, Nümbrecht, D	83.1802
Tissue Culture Dish 35x10 mm	Sarstedt, Nümbrecht, D	83.1800
Tissue Culture Dish 60x15 mm	Sarstedt, Nümbrecht, D	83.1801
Tube Stripes 0,2 ml	Peqlab, Erlangen, D	82-1182-A
Wägeschiffchen, 140×140×22 mm	VWR, Darmstadt, D	611-9170
Wägeschiffchen, 46×46×8 mm	VWR, Darmstadt, D	611-0093
Wägeschiffchen, 85×85×24 mm	VWR, Darmstadt, D	611-9176
Whatman™ Gel Blotting Paper	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK	10 426 994
Whatman™ Membran Filter 0,45 µm, Ø50 mm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK	10 409 772

2.1.10 Geräte

Gerätename	Gerät	Hersteller
AxioImager.Z2	Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, D
EasyPhor PAGE Mini	Westernblot System	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Gasprofi 1 micro	Gasbrenner	WLD-TEC, Göttingen, D
ImageJ, Version 1.48v	Computerprogramm	National Institutes of Health, USA
KERN 440-21N	Präzisionswaage	KERN & Sohn GmbH, Balingen, D
Lab 850	pH-Meter	SI Analytics GmbH, Mainz, D
Mastercycler® gradient	PCR-Cycler	Eppendorf AG, Hamburg, D
Matrix™ Equalizer 30 µl	Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikro 120	Zentrifuge	Hettich AG, Bäch, CH
MR Hei-Standard	Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach, D
Multifuge 3L	Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA
NanoDrop ND-1000	Konzentrationsbestimmung von RNA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA
Nikon C-PS	Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Odyssey® Fc Imaging System	Western Blot Imager	LI-COR Biotechnology, Lincoln NE, USA

„Q Active“ Hybrid Quadrupole Orbitrap MS	Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA
Sigma 1-14K	Tischkühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, D
Sprout	Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Thermomixer® compact	Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Titramax 100	Mikrotiterplatten-Schüttler	Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach, D
Trans-Blot Turbo Transfer System	Westernblot System	BIO-RAD, Hercules CA, USA
Transferpette® S	Mikroliterpipetten	Brandt, Wertheim, D
Varioskan™ Flash Multimode Reader	ELISA-Reader	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA
ViiA 7™	Real Time PCR-System	Life Technologies, Carlsbad CA, USA
Vortex-Genie® 2	Vortexer	Scientific Industries Inc., Bohemia NY, USA
WiseTherm® HPLP-C-P	Digitale Heizplatte	WITEG Labortechnik GmbH, Wertheim, D

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Maus-Genotypen

Als Versuchstiere wurden je nach Versuch sowohl Wildtyp-Mäuse als auch transgene Mäuse verwendet (Kapitel 2.1.1). Zur Bestimmung der Genotypen der transgenen Mäuse erfolgte vor der Untersuchung der Netzhäute jeweils eine Genotypisierungs-PCR. Dazu wurde aus Schwanzbiopsien genomische DNA isoliert, die mithilfe einer PCR auf die Anwesenheit der Transgene VAMP7, Cre und Tox/GFP untersucht wurde (jeweilige Primersequenzen in Kapitel 2.1.6) und mittels Gelelektrophorese dargestellt wurde. Hierfür wurden je 2 µl DNA verwendet und nach abgebildetem Pipettierschema vorbereitet (Tab. 3), wobei alle Pipettierschritte auf Eis durchgeführt wurden. Anschließend erfolgte die PCR nach Gen-abhängigem Protokoll im Thermocycler (Jansohn und Rothhämel 2012, S. 68-76 und S. 135-143).

Die erhaltenen Produkte wurden im Folgenden gelelektrophoretisch analysiert. Hierfür wurde standardmäßig ein 2%iges Agarose-Gel verwendet, für das 4 g Agarose in 200 ml 1x TBE aufgekocht wurden und bei einer Temperatur von 60 °C Midori Green (0,004 %, entspricht 8 µl auf 200 ml, als Alternative zu Ethidiumbromid) hinzugegeben wurde. Nach Auftragung der Proben und des Größenstandards erfolgte der Lauf bei 200 V für 25 Minuten. Anschließend konnten die Banden unter UV-Licht detektiert werden.

Tabelle 3: Pipettierschema für die Genotypisierungs-PCR aus Schwanzspitzen

Substanz	Menge
Template-DNA	2 µl
Mastermix	6,25 µl
Primer 1+2 (je 1:10 mit Aqua dest.)	1,25 µl
Aqua dest.	2,5 µl

2.2.2 Präparation der murinen Retina

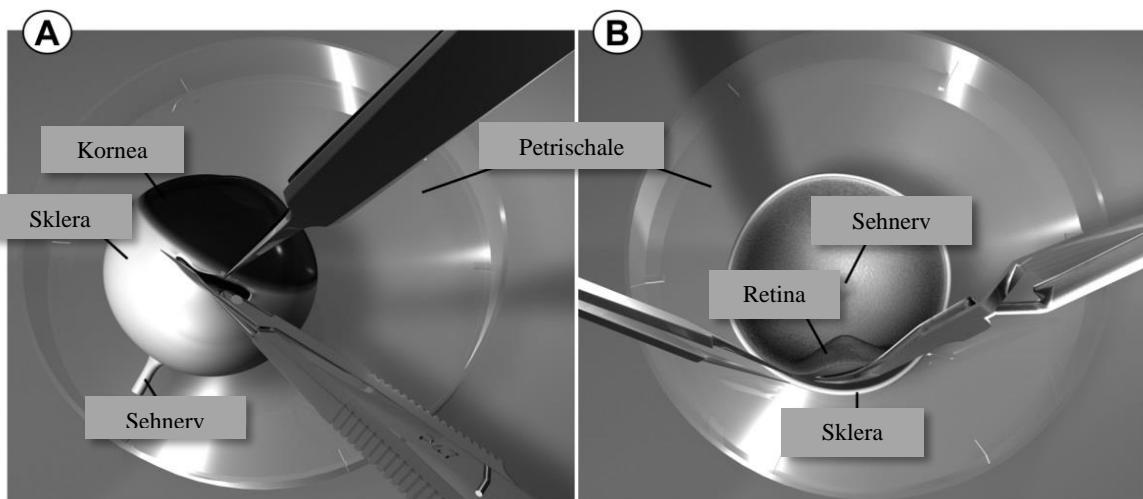


Abbildung 7: Präparationsschritte der Mausretina. (A) Öffnen des Bulbus entlang der Ora serrata; (B) Ausstreichen der Retina aus dem geöffneten Augenbecher.

Grundlage für jedes Experiment war zunächst die Präparation der Netzhaut. Hierfür war ein zügiges Vorgehen sehr wichtig, um ein Austrocknen des Gewebes mit konsekutivem Zelltod zu verhindern. Direkt nach dem Töten der Mäuse mittels Kohlendioxid mussten die Bulbi mit einer gebogenen Pinzette entnommen werden und in PBS/Glucose auf Eis gegeben werden. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Binokularmikroskop. Zu Beginn wurde der Bulbus auf dem Deckel eines 35mm-Petrischälchens mit dem Skalpell durch einen kleinen Einschnitt dorsal der Ora serrata eröffnet (Abb. 7A). Mittels nach ventral greifender gerader Pinzette konnte das Auge durch diese Öffnung fixiert werden. Anschließend wurde die Hornhaut rundherum entfernt, indem mithilfe einer feinen Schere möglichst wenige Schnitte entlang der Ora serrata gemacht wurden (Abb. 7A). Linse und Glaskörper wurden dann mit einer gebogenen Pinzette aus dem Augenbecher herausgestreift.

Die anschließende Entnahme der Retina an sich wurde erleichtert, wenn die sphärische Form des Augenbeckers zunächst erhalten blieb. Deshalb erfolgte der letzte Präparationsschritt schwimmend in PBS/Glucose: Die schwimmende Retina musste ganz vorsichtig mit einer gebogenen Pinzette aus dem Augenbecher gestrichen werden (Abb. 7B), wodurch auch

automatisch der Sehnerv durchtrennt wurde. Sie wurde in PBS/Glucose auf Eis gegeben und konnte dann den weiteren Analysen zugeführt werden.

2.2.3 Histologische Untersuchungen

Histologische Analysen wurden sowohl an Retinaschnitten als auch an retinalen Flachpräparaten durchgeführt.

2.2.3.1 Herstellung und Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten

2.2.3.1.1 Anfertigung von Retinaschnitten

Nachdem die Retina wie unter 2.2.2 beschrieben vorbereitet worden war, wurde sie vorsichtig mithilfe eines feinen Pinsels auf eine mit PBS/Glucose angefeuchtete Whatman®-Membran überführt und darauf ausgebreitet, soweit es ihre sphärische Form zuließ. Nach 60-minütiger Fixierung mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung wurde das Gewebe mit PBS gewaschen und in 3%ige Agarose eingebettet. Dazu wurde Agarose in PBS aufgekocht und mit ihr nach Abkühlen auf 52 °C ein Cryomold®-Einbettenschälchen etwa zur Hälfte gefüllt. Die fixierte Retina wurde darin zügig etwa rechtwinklig zum Schälchenboden orientiert und sofort mit weiterer Agarose überschichtet. Sowohl fixierte als auch eingebettete Retinae konnten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in PBS aufbewahrt werden.

Nach vollständigem Aushärten wurden am Vibratom in PBS Schnitte einer Schichtdicke von 70 µm hergestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Retina möglichst gerade ausgerichtet war, damit parallel zur Ausrichtung der Müllerzellen geschnitten wurde.

2.2.3.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten

Für die Färbungen wurde zwischen zentralen und peripheren Schnitten unterschieden. Zentrale Schnitte konnten daran erkannt werden, dass der Sehnerv angeschnitten war. Diese wurden mittels DAPI, α -Iba1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*), α -GLUT (Glutaminsynthetase) und α -Calretinin gefärbt, periphere Schnitte mittels DAPI, α -Iba1 und α -VAMP7.

Pro Färbung wurde jeweils eine Kavität einer 24-Well-Mikrotiterplatte verwendet. Nach Vorlegen von je 1 ml PBS wurden jeweils fünf Retinaschnitte mit einem Pinsel in eine Kavität überführt. Insgesamt wurden pro Färbung je 300 µl der Blockier- und Antikörperlösungen

(Tab. 4) sowie 400 µl der Waschlösungen verwendet. Alle Inkubations- und Waschschrifte erfolgten auf einem Schüttler bei 150 rpm.

Zunächst wurden die Schnitte 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Dies erfolgte in PBS/3 % DMSO/1 % Triton + 5 % Normalserum. Dabei wurde Eselnormalserum verwendet, da aus dieser Spezies die jeweiligen sekundären Antikörper stammten. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C (Tab. 4). Bei Raumtemperatur erfolgten anschließend drei Waschschrifte à 15 Minuten in PBS/1 % BSA, woraufhin die lichtgeschützte Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern (Tab. 5) in PBS/1 % BSA über Nacht bei 4 °C durchgeführt wurde. Vor dem Eindecken folgten drei weitere jeweils 15-minütige Waschschrifte mit PBS bei Raumtemperatur, anschließend war destilliertes Wasser in die Kavitäten zu geben. Für das Eindecken auf einem Objektträger wurde ein großer Tropfen Aqua dest. auf einen Objektträger pipettiert, in den dann alle Schnitte einer Färbung mit dem Pinsel überführt und darin orientiert wurden. Nach dem vorsichtigen Abnehmen von überflüssigem Aqua dest. mit einer Pasteurpipette wurden die Retinaschnitte mit *ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI* und Deckgläschen eingedeckt.

Tabelle 4: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten

Name	Host	Verdünnung
α-Iba1 (<i>ionized calcium binding adapter molecule 1</i>)	rabbit	1 : 500
α-Calretinin	goat	1 : 500
α-GLUT (<i>Glutaminsynthetase</i>)	mouse	1 : 500
α-VAMP7	mouse	1 : 500

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von Retinaschnitten

Name	Host	Verdünnung
α-goat Cy3	donkey	1 : 100
α-mouse Cy2	donkey	1 : 100
α-rabbit Cy5	donkey	1 : 200

2.2.3.2 Herstellung und Immunfluoreszenzfärbung von retinalen Flachpräparaten

Als retinales Flachpräparat bezeichnet man ein Komplettpräparat, welches ungeschnitten gefärbt wird. Die Herstellung der Flachpräparate erfolgte ähnlich zur eben beschriebenen Herstellung der Retinaschnitte. Nach Fixierung in Paraformaldehyd-Lösung und Waschen in PBS wurden die Retinae jedoch nicht in Agarose eingebettet und zu Schnitten weiterverarbeitet, sondern jeweils geviertelt für die Färbung verwendet. Initial nicht gefärbte Retinae konnten bei

4 °C in 10%igem Natrium-Azid aufbewahrt werden. Alle Inkubations- und Waschschrifte erfolgten analog zur oben beschriebenen Immunfluoreszenzfärbung der Retinaschnitte (Kapitel 2.2.3.1.2, Tab. 4+5). Gefärbt wurde mittels α -Iba1 und DAPI. Da bei den retinalen Flachpräparaten jedoch makroskopisch nicht beurteilbar war, welche Seite die Innen- und welche die Außenseite war, mussten sie so eingedeckt werden, dass sie von beiden Seiten mikroskopierbar waren. Hierfür wurden sie zwischen zwei Deckgläschen eingedeckt, damit das Präparat beim Mikroskopieren auf die geeignete Seite gewendet werden konnte.

2.2.4 Müllerzellisolation mittels MACS® Cell Separation

Ausgangspunkt für jedes Müllerzellexperiment war zunächst die Isolation der Müllerzellen aus der Netzhaut. Im Verlauf meiner Arbeit wurden durch meine Arbeitsgruppe mehrere Varianten des Protokolls zur Müllerzellisolation erprobt und weiterentwickelt. Im Folgenden wird das Vorgehen dargestellt, das sich als am effizientesten erwies. Um die Zellen nicht zu beschädigen und im Speziellen die Fortsätze der Müllerzellen nicht abzureißen, mussten sie mit größter Behutsamkeit behandelt werden. Deshalb wurden für alle Wasch-, Dissoziations- und Resuspensionsschritte heiß polierte *fire-polished*-Pasteurpipetten mit ausreichend großen Öffnungen verwendet. Diese wurden vorher selbst angefertigt, indem die Glaspipetten zunächst gekürzt wurden und dann die Schnittkanten zur Glättung mit einem Gasbrenner kurz abgeflammt wurden.

2.2.4.1 Vorbereitung der Zellsuspension

Für die Müllerzellisolation wurden die präparierten Retinae (Kapitel 2.2.2) in ein Eppendorf-Cup (1,5 ml) mit PBS/Glucose-Lösung überführt. Nach Zugabe von 40 µl Papain auf 1 ml PBS/Glucose erfolgte der Verdau für 30 Minuten bei 37 °C. Dabei wurde der Cup etwa alle 10 Minuten kurz behutsam invertiert. Nach drei vorsichtigen Waschschritten mit PBS/Glucose-Lösung wurde ausgetretene DNA durch den Einsatz von 10 µl DNase I auf 1 ml PBS/Glucose für vier Minuten bei Raumtemperatur abgebaut. Auch hier wurde der Cup zwischendurch vorsichtig invertiert.

Nach Abpipettieren des Überstands wurden die Retinae in 1 ml EZL-Lösung auf schonende Weise solange dissoziiert, bis eine möglichst homogene Zellsuspension entstand.

2.2.4.2 Isolation von Müllerzellen, Endothelzellen, Neuronen und Mikroglia aus der Netzhaut

Die Isolation von einzelnen Zellpopulationen aus der Netzhaut gelang durch positive Selektion mithilfe des MACS®-Systems der Firma Miltenyi Biotec (Abb. 8), dem Goldstandard für Zellseparationen (Grützkau und Radbruch 2010). Dieses *Magnetic Cell Separation*-System besteht aus einem Magneten (*MACS® Separator*), Säulen (*MACS® Columns*), sowie den *MACS® MicroBeads*. Die Säulen werden in den Magneten eingespannt und enthalten ferromagnetische Kugeln, die das Magnetfeld verstärken. Die *MACS® MicroBeads* sind superparamagnetische Partikel, die mit spezifischen Antikörpern konjugiert sind. Diese binden entweder direkt an ein bestimmtes Antigen der Zielzelle oder indirekt durch das Koppeln von Anti-Biotin-MicroBeads an einen Biotin-markierten Antikörper.

In der Praxis funktioniert dies folgendermaßen: Nach Zusammengabe von Zellsuspension und Antikörper-gekoppelten MicroBeads sind die Zielzellen der Suspension durch Kopplung von Antigen-Antikörper-Komplexen entsprechend magnetisch markiert (Abb. 8A). Aufgrund des Magnetfelds werden sie deshalb beim Auftragen einer Zellsuspension auf die im Magneten befindliche Säule in ihr zurückgehalten, während nicht markierte Zellen die Säule unbeeinträchtigt passieren können (Abb. 8B). Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die so nicht mehr magnetisch angezogenen Zielzellen können eluiert werden (Abb. 8C).

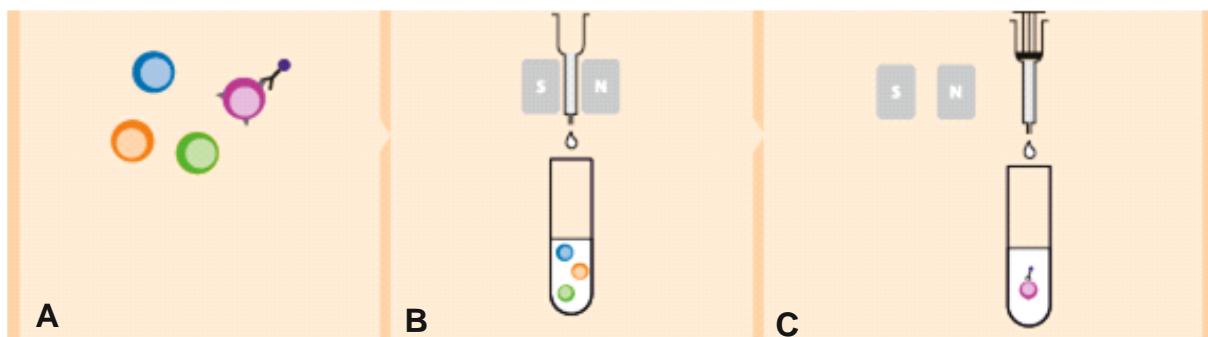


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zellseparation mittels MACS®-System. (A) Magnetische Markierung der Zielzellen; (B) Magnetische Separation der Zielzellen; (C) Elution der markierten Zellfraktion (Miltenyi Biotec 2017, S. 4).

In dieser Arbeit wurden nacheinander für die Isolation von Mikroglia anti-CD11b-direkt gekoppelte Beads (Lim et al. 2013), für die von Endothelzellen anti-CD31-direkt gekoppelte Beads (Mbagwu und Filgueira 2020), und für die von Müllerzellen Biotin-CD29-Antikörper (Grosche et al. 2016) sowie Anti-Biotin-Beads verwendet. Nach Zugabe des jeweiligen Antikörpers wurden die Zielzellen jeweils mithilfe der MACS®-Säulen isoliert (entsprechende

Volumina in Tab. 6). In den ersten Versuchen wurden initial nur Müllerzellen, bzw. nur Müllerzellen und Mikroglia isoliert, bevor in späteren Versuchen auch Endothelzellen isoliert wurden. Welches Protokoll jeweils verwendet wurde, ist an entsprechender Stelle im Ergebnisteil markiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C für 10 Minuten mit 300 g. Die retinale Zellsuspension (Kapitel 2.2.4.1) wurde nach Zentrifugation und Überstandsabnahme in EZL resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit anti-CD11b-gekoppelten Beads für 15 Minuten bei 4 °C. Nach erneutem Verdünnen und Mischen mit EZL mithilfe der oben beschriebenen, präparierten Pipette erfolgte eine erneute Zentrifugation, Überstandsabnahme und das Resuspendieren in EZL. Im Folgenden konnte die Suspension über die Säule isoliert werden und die gleichen Arbeitsschritte analog mit dem CD31-Antikörper durchgeführt werden, einzig mit anderen Volumina (Tab. 6). Für CD29 musste eine indirekte Kopplung erfolgen, da für dieses Protein keine direkt gekoppelten Beads zur Verfügung standen. Deshalb wurde hierfür nach Resuspension zunächst eine Inkubation mit dem Biotin Anti-Ratte CD29-Antikörper für 10 Minuten bei 4 °C durchgeführt, gefolgt von der Zugabe von EZL, Zentrifugation und Überstandsabnahme. In einem Zwischenschritt erfolgte dann bei 4 °C für 15 Minuten die Kopplung von Biotin-markierten Müllerzellen mit Anti-Biotin MicroBeads. Abschließend konnten die Müllerzellen nach Verdünnung in EZL über die Säule eluiert werden. Die Elution funktionierte folgendermaßen: Zunächst wurden die im Separator (hier *OctoMACST™ Separator*) befindlichen Säulen (hier *Large Cell Columns*) gespült, indem je 500 µl EZL darauf gegeben und der Durchfluss verworfen wurde. Anschließend wurde je eine Zellsuspension auf eine Säule pipettiert, gefolgt von drei Spülstufen mit 500 µl EZL. Der gesamte Durchfluss wurde jeweils als Negativfraktion gesammelt. Für die anschließende Elution der Positivfraktion wurde die Säule aus dem Magneten genommen und auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Mit dem mitgelieferten Stempel wurde 1 ml EZL zügig durch die Säule gedrückt. Die so erhaltene Suspension enthielt dann die jeweiligen Zielzellen, also Müllerzellen, Mikroglia oder Endothelzellen. Die verbliebene Negativfraktion enthielt die Neuronen.

Die isolierten Zellfraktionen konnten nachfolgend der weiteren Analyse mittels RNA- (Kapitel 2.2.5), Protein- (Kapitel 2.2.8) oder Exosomenisolation (Kapitel 2.2.11) zugeführt werden. Alternativ wurden isolierte Müllerzellen durch den Kollaborationspartner Dr. Frank Pfrieger (INSERM, Straßburg) anhand einer VAMP5-Färbung mittels Licht- und Elektronenmikroskopie untersucht.

Tabelle 6: Für die MACS®-Zellisolation verwendete Volumina

Substanz	Volumen
EZL + CD11b direkt gekoppelte Beads	90 µl + 10 µl
EZL + CD31 direkt gekoppelte Beads	80 µl + 20 µl
EZL + Biotin Hamster α -rat CD29	100 µl + 25 µl
EZL + Anti-Biotin MicroBeads	100 µl + 25 µl
EZL nach Inkubation mit Beads bzw. Anti-CD29	500 µl
EZL vor MACS®	1.000 µl

2.2.4.3 Reinheitsprüfung der Zellpopulationen

Nach der Zellisolation wurden aus der Müllerzellfraktion und der Negativfraktion Proben für die statistische Auswertung der Experimente entnommen. Dies geschah vor weiterführenden Experimenten mit Müllerzellen, um die Reinheit der Proben und deren Aussagekraft einschätzen zu können.

Routinemäßig wurden jeweils 50 µl der einzelnen Proben entnommen und mit 150 µl 4%igem Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation mit 300 g bei Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Zellen mithilfe einer Pipette, deren Spitze zum Zellschutz abgeschnitten war, in 100 µl PBS resuspendiert und auf einen Objektträger überführt. Die Präparate wurden bei etwa 43 °C auf der Heizplatte getrocknet und bis zur Immunfluoreszenzfärbung staubfrei gelagert.

Für die Färbung wurden die Präparate zuerst mit Lack umrandet, um ein Herauslaufen der verwendeten Lösungen zu verhindern. Insgesamt wurden für die Blockier- und Antikörperlösungen immer je 100 µl/Objektträger verwendet. Alle Blockier- und Färbeschritte erfolgten in einer mit Wasser befüllten Inkubationskammer bei Raumtemperatur, damit die Präparate nicht austrocknen konnten. Als Normalserum wurde immer Serum der Spezies verwendet, aus welcher der zugehörige sekundäre Antikörper stammte.

Die Präparate wurden zunächst mit PBS/1 % DMSO/0,3 % Triton + 5 % Normalserum für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Nach Abkippen der Lösung wurden die primären Antikörper in Blockierlösung auf die Präparate pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS/1 % BSA á 10 Minuten konnten die sekundären Antikörper in PBS/1 % BSA auf die Präparate gegeben werden und wieder für eine Stunde inkubieren (Antikörperschema des Primär- und Sekundärantikörpers in Tab. 7). Abschließend wurden die sekundären Antikörper ebenfalls abgekippt, die Präparate dreimal für

jeweils 10 Minuten mit PBS gewaschen und bis zum Eindecken in Aqua dest. gestellt. Nach vorsichtigem Trocknen erfolgte das Eindecken mit *ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI*.

Zusätzlich konnte die Reinheit der einzelnen isolierten Zellpopulationen mittels TaqMan®-PCR (Kapitel 2.2.7) getestet werden.

Tabelle 7: Antikörperschema für die Immunfluoreszenzfärbungen der aufgereinigten Zellen

Markierte Zellen	1° Antikörper	Verdünnung 1° Antikörper	2° Antikörper	Verdünnung 2° Antikörper
Müllerzellen	Mouse α-GLUT (Matsui Ko, Hosoi Nobutake, Tachibana Masao 1999)	1:500	Goat α-mouse Alexa Fluor 488	1:1.000
Bipolarzellen	Rabbit α-PKCα (Protein kinase C alpha) (Ruether et al. 2010)	1:200	Goat α-rabbit IgG Cy3	1:1.000
Zellkerne	DAPI (bereits im Eideckmedium enthalten)			

2.2.5 RNA-Isolation

Aus den separierten Zellfraktionen (Kapitel 2.2.4.2) konnte mithilfe des *RNeasy Micro Kits* der Firma QIAGEN nach dem im Folgenden dargestellten Protokoll des Herstellers RNA isoliert werden. Diese wurde benötigt, um sie anschließend in cDNA umschreiben zu können (Kapitel 2.2.6) und sie schließlich TaqMan® Real-Time PCR-Analysen (Kapitel 2.2.7) zuzuführen. Alle verwendeten Materialien und Lösungen außer β-Ethanol und DNase I wurden direkt aus dem Kit verwendet.

Vor Beginn der RNA-Isolation wurden die Arbeitsfläche und alle verwendeten Materialien gründlich mit RNaseZap® gereinigt, um eine Einbuße der Ausbeute durch RNase zu minimieren. Zudem wurden alle Schritte mit Handschuhen durchgeführt. Jede Zentrifugation geschah bei 12.000 rpm für 15 Sekunden mit geschlossenem Säulendeckel, sofern nicht im Folgenden anders erwähnt. Ausgehend von den Zellsuspensionen wurden die Proben initial bei 2.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die zugehörigen Zellpellets wurden in 350 µl RLT-Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol mithilfe einer 23G-Nadel gründlich homogenisiert, was gleichzeitig ein mechanisches Aufbrechen der Zellen zur Folge hatte. Anschließend konnte das Homogenisat mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt und auf die Membran einer *RNeasy MinElute spin column* aufgetragen werden, die sich auf einem 2 ml-Sammeltube befand. Nach Zentrifugation wurde der sich im Tube befindliche Durchfluss

verworfen und nach Auftragen von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit konsekutivem Verwerfen des Durchflusses. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur für 15 Minuten eine Inkubation auf der Säule mit 10 µl DNase I Stock-Lösung und 70 µl RDD-Puffer, die vorher gut vermischt wurden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt nach Auftragen von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule wurde das Sammeltube mitsamt dem Durchfluss verworfen und die jeweilige Säule auf ein neues 2 ml-Sammeltube gesetzt. Dann konnten 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert werden, zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen werden. Nach dem nächsten, diesmal zweiminütigen Zentrifugationsschritt, der nach Zugabe von 500 µl 80%igem Ethanol erfolgte, wurde das Sammeltube erneut durch ein neues 2 ml-Sammeltube ersetzt. Zum Trocknen musste dieses mit der Säule bei geöffnetem Deckel mit 14.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert werden. Anschließend konnte die Elution der RNA erfolgen, nachdem Durchfluss und Tube verworfen und die Säule auf ein 1,5 ml-Sammeltube gesetzt worden war. Hierfür wurden 14 µl RNase-freies Wasser zentral auf die Membran gegeben und für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die RNA und musste sofort auf Eis gesetzt werden. Der Elutionsschritt mit RNase-freiem Wasser wurde ein zweites Mal durchgeführt, um die Ausbeute zu erhöhen, und ebenfalls sofort auf Eis gelagert. Nach Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA im *NanoDrop*TM-Gerät konnte die RNA bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.2.6 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese im Rahmen dieser Arbeit erfolgte als Vorbereitung für eine TaqMan[®]-PCR (Kapitel 2.2.7), ausgehend von aus der Netzhaut isolierter RNA (Kapitel 2.2.5). Hierfür wurde das *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von ThermoFisher Scientific verwendet und anhand des Protokolls des Herstellers vorgegangen. Ziel war das Umschreiben von je 100 ng RNA pro Probe. Da jedoch bei der RNA-Isolation teilweise nur geringere RNA-Konzentrationen pro Probe erreicht werden konnten, wurde die Menge der pro Versuch umzuschreibenden Template-RNA entsprechend der Probe mit der niedrigsten RNA-Menge reduziert (Volumen je nach jeweiliger im *NanoDrop*TM-Gerät bestimmter RNA-Konzentration). Analog zur RNA-Isolation wurde mit Handschuhen gearbeitet und alle Materialien und der Arbeitsplatz wurden vor Experimentbeginn mit RNaseZap[®] gereinigt. Alle verwendeten Reagenzien sowie die in Wasser eluierte RNA (Kapitel 2.2.5) standen während des Protokolls auf Eis.

Zunächst wurde die Sekundärstruktur der RNA denaturiert, indem ihr in nuklease-freien Stripes je 1 µl Random-Hexamer-Primer hinzugefügt wurde und der Ansatz mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt wurde. Nach Mischen mittels vorsichtigem Schnipsen gegen die Stripes und kurzem Zentrifugieren mussten die Proben für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend zum Abkühlen wieder auf Eis gesetzt werden. Dann wurden je 8 µl Mastermix hinzugefügt (Pipettierschema in Tab. 8), die Proben erneut gemischt und für wenige Sekunden zentrifugiert. Abschließend konnten die Proben im ThermoCycler in cDNA umgeschrieben (Synthesekonditionen in Tab. 9) und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt werden.

Tabelle 8: Pipettierschema für den Mastermix der cDNA-Synthese

Substanz	Volumen
5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid H Minus M – MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl

Tabelle 9: Konditionen der cDNA-Synthese im MasterCycler

Temperatur	Dauer
Inkubation bei 25 °C	5 Minuten
Synthese bei 42 °C	60 Minuten
Stop bei 70 °C	5 Minuten
4 °C	hold

2.2.7 TaqMan® Real-Time PCR

Die TaqMan® Real-Time PCR ist eine quantitative PCR, deren Ziel es ist, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge an eingesetzter Ausgangs-DNA zu schließen. In dieser Arbeit sollte die Transkriptmenge bestimmter Gene ermittelt werden. Dafür müssen die PCR-Produkte während der Reaktion markiert werden. Im vorliegenden Fall wurden hierfür sequenzspezifische, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sondenmoleküle verwendet. Sie tragen an ihrem 5'-Ende ein Fluorophor und an ihrem 3'-Ende einen Quencher und binden spezifisch nur an das gewünschte PCR-Produkt.

Bei der TaqMan®-PCR binden nach der initialen Denaturierung (Abb. 9A) während des folgenden Primer-Bindungsschritts neben den PCR-Primern auch die fluoreszenzmarkierten Sonden an die Zielsequenz (Abb. 9B). Solange die Sonden intakt sind, unterdrückt der

Quencher zunächst das Signal des Fluorophors. Wenn die Taq-DNA-Polymerase jedoch während der Synthese des Zweitstrangs die an der cDNA hybridisierte Fluoreszenzsonde erreicht, wird diese durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolytisch gespalten, sodass Quencher und Fluoreszenz-Reporter getrennt werden. Aufgrund ihres größeren Abstands kann das Fluoreszenzsignal dann nicht mehr unterdrückt werden (Abb. 9C). Eine Anregung des Reporters führt zur Emission eines Fluoreszenzsignals definierter Wellenlänge, das mithilfe eines *Light cyclers* (Real Time PCR System ViiA 7™, Life Technologies, Carlsbad, USA) gemessen werden kann. Es ist direkt proportional zur Anzahl der verbrauchten Sonden bzw. neu gebildeten DNA-Stränge und somit proportional zur Menge der Ausgangs-DNA (Jansohn und Rothhämel 2012, S. 163-171).

Die Quantifizierung des Signals kann dann entweder absolut oder relativ erfolgen, wobei in dieser Arbeit das Prinzip der relativen Quantifizierung verwendet wurde. Im optimalen Fall wird in der Genexpressionsanalytik ein je nach Experiment und Gewebe ausgewähltes sog. *housekeeping*-Gen verwendet, dessen Expression in verschiedenen Geweben konstant ist. Das ermittelte Verhältnis zwischen Zielsequenz und Referenztranskript kann dann mit dem entsprechenden Verhältnis aus anderen TaqMan®-Läufen verglichen werden und so die relative Änderung der Genexpression abgeleitet werden (Jansohn und Rothhämel 2012, S. 163).

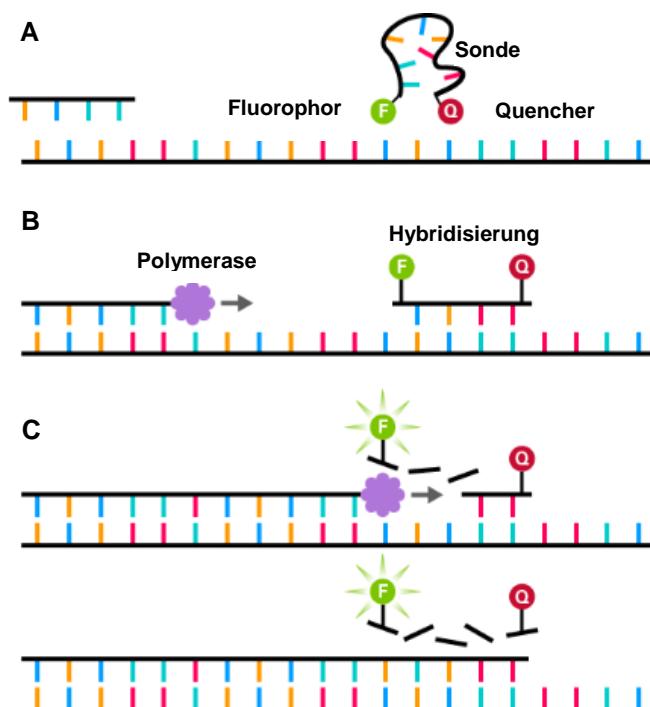


Abbildung 9: Schema der TaqMan®-PCR. (A) Denaturierung der cDNA; (B) Binden von PCR-Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden an die Zielsequenz; (C) Spaltung der Fluoreszenzsonde durch die Taq-Polymerase mit konsekutiver Trennung von Quencher und Fluoreszenz-Reporter, sodass das Fluoreszenzsignal nicht mehr unterdrückt werden kann (adaptiert nach Takara Bio Inc. 2018).

2.2.7.1 Probenvorbereitung

Konkret musste zunächst für jedes Primerpaar ein Mastermix hergestellt werden (Tab. 10). Dabei war es wichtig, dass die Sonden immer lichtgeschützt gelagert wurden. Die Anzahl der Ansätze richtete sich nach der doppelten Anzahl der zu untersuchenden cDNA-Proben mit zusätzlicher Wasserprobe und zusätzlichen Ansätzen wegen etwaiger Pipettierungenuigkeits. Anschließend wurden die vorbereiteten cDNA-Proben (20 µl; 2.2.6) auf Eis aufgetaut und mit je 40 µl Millipore-Wasser aufgefüllt.

Tabelle 10: Mastermix für die TaqMan® -PCR (pro cDNA-Probe)

Substanz	Volumen
2x Mastermix	5 µl
Forward Primer (1:10 verdünnt)	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Sonde (je nach Primer)	0,125 µl
Millipore-Wasser	0,375 µl

2.2.7.2 Auftragen und Auswerten der Proben

Das Befüllen der 384-Well-Platten erfolgte mithilfe einer Matrix™ Equalizer Mehrkanalpipette. Zunächst wurden die cDNA-Proben aufgetragen. Hierzu wurden für jedes Gen zweimal je 2,5 µl der Proben und der H₂O-Kontrolle auf den Boden der Wells pipettiert. Die H₂O-Kontrolle sollte bei der späteren Analyse Pipettierungenuigkeiten ausgleichen können. Die anschließend aufgetragenen je 7,5 µl des vorher hergestellten Primer-spezifischen Mastermix wurden jeweils an den oberen Rand der Wells pipettiert, um eine Kontamination der Pipettenspitzen mit den cDNA-Proben zu vermeiden. Nach sorgfältiger Versiegelung der Platte mittels *MicroAmp® Optical Adhesive* Film wurde diese für 4 Minuten bei 4.000 g zentrifugiert und anschließend direkt im *ViiA™ 7 Real-Time* PCR-System in 40 Zyklen analysiert oder bis zur Analyse bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Die Ergebnisse wurden mit Excel und GraphPad Prism 6.03 ausgewertet.

2.2.8 Proteinisolation

In dieser Arbeit wurden mehrere unterschiedliche Verfahren zur Proteinextraktion aus Netzhäuten angewandt. Dabei wurde einerseits Gesamtprotein aus allen Netzhautzellen (Kapitel 2.2.2) und den einzelnen Zellfraktionen (Kapitel 2.2.4) isoliert, andererseits wurden zwei verschiedene Verfahren zur Isolation von Membranproteinen getestet. Wichtig war bei

jedem Protokoll, dass durchgehend auf Eis gearbeitet werden musste. Falls eine Isolation aus Zellfraktionen erfolgen sollte, wurden die nach dem Protokoll in Kapitel 2.2.4 isolierten Zellfraktionen vorher für 10 Minuten bei 900 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ganze Retinae konnten nach Überstandsabnahme direkt weiterverwendet werden. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C, sofern nicht anders angegeben.

2.2.8.1 Isolation von Gesamtprotein

Für die Standard-Proteinisolation wurden die Pellets aus Gesamtretina oder Zellfraktionen in je 150 µl gebrauchsfertigem RIPA-Puffer mechanisch und chemisch aufgetrennt, indem sie mit einer 1 ml-Spritze mit Kanülen absteigender Dicke (20G, dann 23G, dann 27G) vielfach eingesogen und wieder herausgespritzt wurden. Anschließend erfolgte für 30 Minuten eine Inkubation auf Eis, wobei alle 5 Minuten gevortext wurde. Zuletzt wurden die Proben für 15 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert, der so entstandene Überstand enthielt die Proteinfraktion. Er konnte aliquotiert und nach einer Konzentrationsbestimmung (Kapitel 2.2.8.3) bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.2.8.2 Isolation von Membranproteinen

Da die in dieser Arbeit vorrangig untersuchten Proteine membranständig waren, erfolgten nicht nur Experimente an Gesamtprotein, sondern auch gezielte Analysen von Membranproteinen im Vergleich zu zytosolischen Proteinen. Für die Isolation von Membranproteinen wurden zwei unterschiedliche Protokolle getestet, die im Folgenden beschrieben werden.

Zum einen wurde ein Standard-Protokoll für Membranisolationen verwendet. Hierfür musste das Zellpellet (Kapitel 2.2.2 bzw. Kapitel 2.2.4) in 1 ml PBS mithilfe von Nadeln absteigender Dicke resuspendiert und anschließend für 5 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand konnte verworfen werden und das Pellet in 300 µl PBS resuspendiert werden. Vom dadurch zunächst erhaltenen Gesamtprotein wurden dann zum Vergleich 100 µl entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung mit 25 µl Lämmlipuffer auf Eis gestellt. Die eigentliche Membranproteinisolation der restlichen 200 µl erfolgte mithilfe von Sonifikation. Bei einer Amplitude von 39 % wurden die Proben dreimal für je 10 Sekunden sonifiziert. Dabei war darauf zu achten, dass die Sonde etwa zu $\frac{1}{3}$ in die Probe zu halten war und sie die Wand des Cups nicht berührte. Nach einer weiteren Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen, der jetzt die Zytosolfraktion enthielt, und für weitere Analysen ebenfalls mit 50 µl Lämmlipuffer auf Eis gestellt. Das zugehörige Pellet konnte dann mithilfe

einer dünnen 27G-Nadel in 500 µl PBS resuspendiert und anschließend erneut 30 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert werden. Diesmal wurde der Überstand verworfen, das Pellet wieder in 200 µl PBS resuspendiert und wie oben sonifiziert. Die erhaltene Suspension entsprach der Membranfraktion. Alle Fraktionen wurden anschließend direkt weiterverarbeitet (Kapitel 2.2.10), der Konzentrationsbestimmung zugeführt (Kapitel 2.2.8.3) oder bei -20 °C gelagert.

Alternativ erfolgte die Membranproteinisolation mithilfe des *Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kits* (ThermoFisher Scientific) nach dem Hersteller-Protokoll für *soft tissue*: Etwa 20 - 40 mg Gewebe, entsprechend etwa 4 Netzhäuten, wurde im Eppendorf-Cup mit 4 ml der *cell wash solution* versetzt, vorsichtig mehrmals invertiert und der Überstand verworfen. In 1 ml Permeabilisierungspuffer folgte anschließend ein gründliches Homogenisieren mithilfe einer 1 ml-Spritze mit einer absteigender Kanüldicke von zuerst 23 G, dann 27 G. Nach nochmaliger Zugabe von 1 ml Permeabilisierungspuffer und Mischen wurde das Homogenisat in ein neues Cup überführt und für 10 Minuten auf dem Rollmischer inkubiert. Die anschließende Trennung der Membran- und Zytosolfraktion erfolgte, indem mit 16.000 g für 15 Minuten zentrifugiert wurde und der Überstand vorsichtig als Zytosolfraktion abgenommen wurde. Nach Resuspendieren des jeweiligen Pellets in 1 ml Solubilisierungspuffer durch gründliches hoch- und herunterpipettieren und anschließender erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 16.000 g erhielt man die Membranfraktion, die sich nun im Überstand befand. Beide Fraktionen wurden direkt weiterverarbeitet (Kapitel 2.2.10), bei -80 °C gelagert oder der Konzentrationsbestimmung zugeführt (Kapitel 2.2.8.3).

2.2.8.3 Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration

An die oben beschriebenen Proteinisolationen aus Retina schloss sich jeweils eine colorimetrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford mithilfe von Reagenzien des *RC DC Protein Assay Reagents Package* (BIO-RAD) an. Vor dem ersten Versuch musste ein Proteinstandard aus einer Stammlösung mit einer BSA-Konzentration von 3 mg/ml hergestellt werden (Tab. 11). Dieser Proteinstandard konnte bei -20 °C aufbewahrt und für weitere Versuche wiederverwendet werden. Vor der Messung im *Varioskan™ Flash Multimode Reader* wurde nach entsprechendem *Microplate Assay*-Protokoll eine 96-Well-Mikrotiterplatte gefüllt. Hierfür wurden zuerst je 5 µl der Probe bzw. des Standards als Duplets vorgelegt. Daraufhin wurden zügig und möglichst luftblasenfrei je 25 µl Reagent A', bestehend aus

24,5 µl Reagent A und 0,5 µl Reagent S, sowie anschließend 200µl Reagent B hinzugegeben und die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend konnte die Absorbanz bei 650 nm gemessen werden. Die Konzentrationsberechnung erfolgte in Excel. Nach Nullwertkorrektur, die der Absorbanz von Aqua dest. entsprach, wurden jeweils die Mittelwerte der beiden Dupletmessungen bestimmt. Nach Auftragen der Absorbanz gegen die bekannten Proteinkonzentrationen des Proteinstandards wurde eine Ausgleichsgerade erstellt und über die Funktion dieser Geraden die Ergebniskonzentration der Proteinproben ermittelt.

Tabelle 11: Pipettierschema für den BSA-Standard zur colorimetrischen Konzentrationsbestimmung nach Bradford

	BSA-Konzentration	Aqua dest.	Proteinlösung
Proteinstandard 1	3 mg/ml	0 µl	1.000 µl (der Stammlösung)
Proteinstandard 2	1,5 mg/ml	500 µl	500 µl (der Stammlösung)
Proteinstandard 3	0,75 mg/ml	750 µl	250 µl (der Stammlösung)
Proteinstandard 4	0,375 mg/ml	1750 µl	250 µl (der Stammlösung)
Proteinstandard 5	187,5 µg/ml	500 µl	500 µl (des Proteinstandards 4)
Proteinstandard 6	93,75 µg/ml	750 µl	250 µl (des Proteinstandards 4)
Proteinstandard 7	46,875 µg/ml	875 µl	125 µl (des Proteinstandards 4)
Leerwert	-	1.000 µl	-

2.2.9 Immunpräzipitation

Unter dem Begriff der Immunpräzipitation (IP) versteht man das Ausfällen von Antigen-Antikörper-Komplexen, indem die Immunkomplexe ein übergeordnetes Netz bilden. Diese Methode wird für eine Vielzahl von Einsatzgebieten genutzt. In vorliegender Arbeit wurde sie zum Nachweis der SNARE-Proteine VAMP3, VAMP5 und VAMP7 sowie deren Interaktionen mit anderen Proteinen verwendet. Die Präzipitation selbst erfolgte mithilfe von an Sepharose gebundenen bakteriellen Proteinen A und G, an die Antikörper binden. Da die Antikörper über ihren Fc-Teil an diese Proteine binden, sind die Antigenbindestellen der Antikörper für die Antigene der Zielproteine gut zugänglich (Abb. 10; Luttmann et al. 2014).

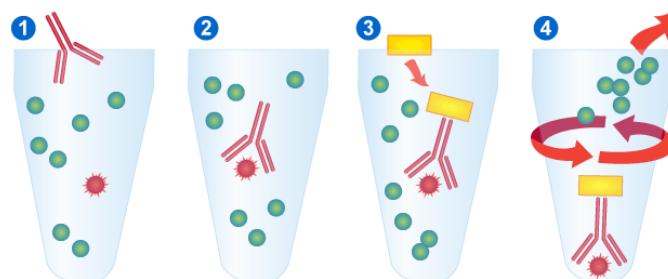


Abbildung 10: Schema der Immunpräzipitation. (1), (2) Bindung des zum Lysat hinzugegebenen spezifischen Antikörpers (rot) an das Zielprotein (rot); (3) Bindung des Antikörpers an Protein A-/G-Beads (gelb) und Präzipitation, ggf. gemeinsam mit etwaigen an das Zielprotein gebundenen Interaktionspartnern; (4) Entfernung von Restproteinen (grün) mittels Zentrifugation und Waschen (Leinco Technologies 2019).

Insgesamt wurde pro Antikörper ca. 1 mg Protein eingesetzt, was laut vorheriger colorimetrischer Konzentrationsbestimmung etwa 4 Netzhäute entsprach. Die Netzhäute (Kapitel 2.2.2) mussten zunächst in gebrauchsfertigem RIPA-Puffer mechanisch und chemisch lysiert werden. Anschließend wurden pro Ansatz je 5 µl Antikörper, und zwar Anti-VAMP3, Anti-VAMP5, Anti-VAMP7, Ratte-Kontroll-IgG oder Maus-Kontroll-IgG, in Eppendorf-Cups pipettiert und die Antikörper-Lysat-Gemische für vier Stunden auf dem Rotator bei 4 °C inkubiert. Währenddessen mussten pro Ansatz je 25 µl Protein G-Beads gewaschen werden. Dazu wurden sie dreimal in je 200 µl TBS mit 0,5 % NP40 (Nonidet P-40) resuspendiert und anschließend für fünf Minuten bei 2.000 g zentrifugiert. Dabei diente das Nonidet als nichtionisches Detergens zum Abschwächen hydrophober Wechselwirkungen. Hierdurch konnten schwache, unspezifische Protein-Antikörper-Bindungen minimiert werden. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die gewaschenen Beads zum Antikörper-Lysat-Mix hinzugegeben und auf dem Rotator bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend konnten die Komplexe aus Antikörper, Antigen und an Sepharose gebundenen Proteinbeads durch fünfminütige Zentrifugation mit 4.000 g gewonnen werden. Da die Komplexe nun an die feste Phase Sepharose gekoppelt waren, fanden sie sich nach Zentrifugation im Pellet. Der Überstand wurde verworfen und die Immunkomplexe erneut zweimal in TBS mit 0,5 % NP40 gewaschen. Abschließend erfolgten zwei Waschschrifte nur in TBS, da Nonidet mit dem Massenspektrometer interferieren kann. Zur Eluierung der gebundenen Proteine wurden die Proben dann mit je 30 µl 1x Lämmlipuffer für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 4.000 g konnten die jetzt löslich gemachten Proteine als Überstand abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die auf diese Weise isolierten Proteine wurden anschließend für Western Blot-Analysen (Kapitel 2.2.10) oder für Untersuchungen mittels Massenspektrometrie verwendet. Für die massenspektrometrischen Analysen wurden die eluierten Proteine an den Kooperationspartner Dr. Stefanie Hauck am Helmholtz Zentrum in München, Abteilung Proteinwissenschaften, übersendet.

2.2.10 Western Blot

Mithilfe des Western Blotting können Proteine nach gelelektrophoretischer Auf trennung auf eine Membran überführt und dort spezifisch mithilfe von Antikörpern nachgewiesen werden (Jansohn und Rothamel 2012, S. 279). Hierzu müssen die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt werden.

2.2.10.1 Proteinvorbereitung

Nach Isolation aus der Netzhaut (Kapitel 2.2.8) mussten die Proteine für die Elektrophorese vorbereitet werden. Um ein quantitatives Blotting durchzuführen, wurde die entsprechende Proteinmenge nach colorimetrischer Konzentrationsbestimmung (Kapitel 2.2.8.3) auf Eis mit gebrauchsfertigem RIPA-Puffer auf je 10 µl Probenvolumen aufgefüllt. Nach Zugabe von je 2 µl 6x-Ladepuffer erfolgte das Denaturieren der Proteine für 15 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurden die Proteinproben bis zum Beladen des Gels wieder auf Eis gestellt.

2.2.10.2 Herstellung der Polyacrylamid-Gele

Während des Inkubationsschritts erfolgte die Vorbereitung der Gele. Zunächst wurde das Trenngel hergestellt (Tab. 12) und zügig bis etwa 1cm unterhalb der Kammlinie zwischen zwei Western Blot-Glasplatten pipettiert. Dabei wurde je nach Proteingröße und Experiment ein unterschiedlicher Acrylamidgehalt gewählt (12 %, 15 % oder 17,5 % Acrylamid). Um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten, musste das Gel sofort mit Aqua dest. überschichtet werden. Nach der ca. 15 Minuten dauernden Auspolymerisierung wurde das Trenngel nach Abgießen des Aqua dest. zügig bis zum Oberrand der Glasplatten mit Sammelgel (Tab. 12) überschichtet und ein Kamm eingesetzt.

Tabelle 12: Pipetterschema zur Herstellung von 2 Polyacrylamid-Gelen

Substanz	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Trenngel 17,5 %	Sammelgel
Aqua dest.	5,25 ml	3,75 ml	2,5 ml	4,2 ml
30 % Stock Acrylamide Solution	6 ml	7,5 ml	8,75 ml	0,65 ml
4x Resolving Tris Solution	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
4x Stacking Gel Tris Solution	-	-	-	1,6 ml
10 % Ammoniumpersulfat	150 µl	150 µl	150 µl	67 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	6,7 µl

2.2.10.3 SDS-Page und Blotting

Sobald auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden die Glasplatten mitsamt ihrer Halterung in eine Kammer (*EasyPhor PAGE Mini Westernblot System* von Biozym) überführt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt, sodass die gesamte Innenkammer und etwa 3 cm der Außenkammer mit Puffer bedeckt waren. Nach vorsichtiger Entfernung der Plastikkämme konnten die Proben sowie 5 µl des Proteinstandards (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra*

Standards) jeweils in die einzelnen Geltaschen pipettiert werden. Es folgte ihre Auftrennung unter den in Tabelle 13 aufgeführten Konditionen.

Beim anschließenden Blotting wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Im Rahmen der Etablierung eines Western Blot-Protokolls für die in meiner Arbeit untersuchten Proteine kamen sowohl *Wet-Blotting* als auch *Semidry-Blotting* zum Einsatz.

Für das Wet-Blotting wurden sowohl die Blotting-Pads als auch das Whatman® Blotting-Papier und das Gel vorher mit Towbin-Puffer durchtränkt. Die verwendete Membran, je nach Experiment entweder eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid) oder eine Nitrocellulose-Membran, musste vor dem Blotten kurz in Methanol aktiviert werden. Nach Zusammensetzen der Blotkassetten wurden sie unter Kompression in das Blottingmodul eingesetzt. Dieses musste mit Towbin-Puffer bis zur Maximalmarkierung aufgefüllt und auf Eis gesetzt werden, anschließend konnte das Blotting auf die Membran erfolgen (Tab. 13). Beim alternativen Semidry-Blotting wurde nach zehnminütiger Äquilibrierung des Gels in Towbin-Puffer auf eine PVDF-Membran geblottet (Tab. 13).

Tabelle 13: Konditionen der Gelelektrophorese und des Blottings beim Western Blot

	Spannung	Stromstärke	Dauer
Gelelektrophorese	225 V	90 mA	40 Minuten
Wet-Blotting	100 V	400 mA	50-90 Minuten
Semidry-Blotting	24 V	1 A	40 Minuten

2.2.10.4 Nachweis der gesuchten Proteine

Zum Nachweis eines erfolgreichen Proteintransfers auf die Membran konnte eine Ponceau-Färbung erfolgen. Hierfür wurde die Membran kurz in Ponceau-Rot eingelegt und anschließend mehrmals durch Aqua dest. geschwenkt. Im Gegensatz dazu erfolgte der spezifische Nachweis einzelner Proteine mittels immunologischer Färbung. Western Blot-Nachweise der in dieser Arbeit untersuchten Proteine erwiesen sich insgesamt als äußerst schwierig. Die Etablierung eines reproduzierbaren Protokolls war Teil meiner Dissertation und die verschiedensten Konditionen, Blockierlösungen, Verdünnungen, Antikörper und Antikörperlösungen wurden evaluiert. Tabelle 14 zeigt die schließlich etablierten, am besten funktionierenden Protokolle für die jeweiligen gesuchten Proteine. Die nicht reproduzierbaren oder nicht erfolgreichen Konditionen sind nicht aufgeführt.

Tabelle 14: Etablierte Western Blot-Konditionen für den Proteinnachweis in der Retina (T: Tween)

Protein	Acrylamidgehalt des Gels	Blotting	Verdünnung Primärantikörper	Host
VAMP3	17,5 %	Semidry auf Nitrozellulose	1:1.000	rabbit
VAMP5	15 %	Wet-Blotting auf Nitrozellulose	1:6.000	rabbit
VAMP7	15 %	Wet-Blotting auf Nitrozellulose	1:1.000	mouse
CD63	15 %	Semidry auf PVDF-Membran	1:1.000	rabbit
Beta-Aktin	12 %	Wet-Blotting auf PVDF-Membran	1:20.000	mouse
CD29, CD9, VGLUT3, NDRG1, EIF4A1	Noch nicht etabliert			

Protein	Blockierlösung	Inkubationslösung Primärantikörper	Inkubationslösung Sekundärantikörper	Waschpuffer
VAMP3	5 % Milchpulver in TBS-T _{0,05} %	5 % BSA in TBS-T _{0,05} %	5 % Milchpulver in TBS-T _{0,05} %	TBS
VAMP5	3,5 % Milchpulver in PBS	0,5 % Milchpulver in PBS	0,5 % Milchpulver in PBS	PBS
VAMP7	5 % ngs, 5 % Milchpulver in PBS-T _{0,1} %	5 % ngs, 5 % Milchpulver in PBS-T _{0,1} %	5 % ngs, 5 % Milchpulver in PBS-T _{0,1} %	5 % Milchpulver in PBS-T _{0,1} %
CD63	5 % Milchpulver in TBS-T _{0,1} %	5 % Milchpulver in TBS-T _{0,1} %	5 % Milchpulver in TBS-T _{0,1} %	TBS-T _{0,1} %
Beta-Aktin	3,5 % Milchpulver in TBS-T _{0,05} %	3,5 % Milchpulver in TBS-T _{0,05} %	3,5 % Milchpulver in TBS-T _{0,05} %	TBS-T _{0,05} %
CD29, CD9, VGLUT3, NDRG1, EIF4A1	Noch nicht etabliert			

Nach dem Blotten wurden die Membranen zunächst blockiert und anschließend mit den Primär- und Sekundärantikörpern auf einem Schüttler inkubiert. Dabei wurde der Proteinstandard jeweils getrennt behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Der Sekundärantikörper wurde analog zum Wirt des Primärantikörpers gewählt und mit einer Verdünnung von 1:10.000, bzw. mit 1:20.000 im Falle des CD63-Blots, eingesetzt. Bezuglich der Inkubationsbedingungen erwies sich für den Primärantikörper die Inkubation über Nacht bei 4 °C, für den Sekundärantikörper sowie das Blockieren eine Inkubation von jeweils einer

Stunde bei Raumtemperatur als das effektivste Vorgehen. Waschschritte erfolgten nach jedem Antikörperschritt für je einmal eine Minute und dreimal 20 Minuten. Anschließend wurden die Membranen mittels *WesternSure[®] PREMIUM Chemiluminescent Substrate* im *Odyssey[®] Fc-Imager* entwickelt.

2.2.11 Isolation von Exosomen

Für die Isolation von Exosomen aus kultivierten Müllerzellen wurden in dieser Dissertation zwei unterschiedliche Kits bzw. Protokolle (Firma QIAGEN und Firma Invitrogen) erprobt und miteinander hinsichtlich der erzielten Ergebnisse verglichen.

2.2.11.1 Zellkultur aus den Zellfraktionen der Retina

Um Exosomen aus ihnen isolieren zu können, mussten die Zellfraktionen der Retina (Kapitel 2.2.4) zunächst in Kultur genommen werden. Für das Kulturmedium wurden in der Zellkultur 5 ml *Neuro-Medium* (Miltenyi Biotec), 100 µl *NeuroBrew* (Miltenyi Biotec) und 25 µl *Antibiotic-Antimycotic* (Thermo Fisher Scientific Inc.) zusammenpipettiert. Hiervon mussten daraufhin je 500 µl in Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte vorgelegt werden. Nach Zentrifugation der Zellfraktionen für 10 Minuten bei 300 g konnte der erzielte Überstand bis auf ca. 50 µl verworfen werden, woraufhin die sich am Boden des Cups befindlichen Zellen im verbliebenen Volumen resuspendiert und jeweils in das Kulturmedium eines Wells überführt wurden. Mit geschlossenem Deckel erfolgte dann im Inkubator die Inkubation bei 37 °C für ca. 22 Stunden. Anschließend konnte das Zellwachstum unter dem Mikroskop abgeschätzt werden. Die Exosomenfraktion befand sich nun im Überstand der Wells, die Zellfraktionen auf deren Boden. Für die Exosomen wurden je 400 µl des Überstands abgenommen und der Überstand von zwei gleichen Fraktionen gepoolt, sodass Proben von je 800 µl entstanden.

2.2.11.2 Isolation von Exosomen-RNA (Firma QIAGEN)

Für das Protokoll der Firma QIAGEN wurden alle Reagenzien außer Chloroform und Ethanol aus dem Kit verwendet. Zu Beginn wurde der Zellkulturüberstand zunächst für 10 Minuten bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit gleichem Volumen XBP-Puffer mehrmals invertiert. Der Probe-Puffer-Mix musste dann jeweils auf eine mitgelieferte *exoEasy spin column* gegeben und für eine Minute bei 500 g zentrifugiert werden. Nach Verwerfen des Durchflusses und erneutem Aufsetzen der Säule auf das Sammeltube wurden 3,5 ml XWP-Puffer auf die Säule gegeben und bei 5.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Säule konnte nun in ein neues Sammelröhrchen gesetzt werden. Nach Zugabe von 700 µl *QIAzol* auf die

Membran wurde erneut für 5 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert und diesmal das so erhaltene Lysat in ein neues 2 ml-Tube überführt. Dieses wurde gründlich gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 90 µl Chloroform unter dem Abzug wurde das Tube für 15 Sekunden gut geschüttelt und nach zwei- bis dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend waren deutlich zwei Phasen zu unterscheiden.

Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur und 8.000 g für 15 Sekunden, sofern nicht anders angegeben. Die obere, wässrige Phase musste in ein neues Cup überführt werden, wobei darauf zu achten war, keine Bestandteile der Interphase mit abzunehmen. Anschließend wurde das doppelte Volumen der sich im neuen Cup befindlichen wässrigen Phase in Form von 100%igem Ethanol hinzugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden maximal 700 µl der Probe gemeinsam mit jeglichem möglichen Präzipitat auf eine neue, auf einem 2 ml-Sammeltube sitzende, *RNeasy MinElute spin column* pipettiert und zentrifugiert. In einem weiteren Schritt konnte etwaiges noch verbliebenes Probenvolumen nach gleichem Schema auf dieselbe Säule gegeben und zentrifugiert werden. Nacheinander wurden anschließend 700 µl RWT-Puffer sowie zweimalig 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der letzte Zentrifugationsschritt allerdings erfolgte für zwei Minuten. Im Anschluss wurde die Säule auf ein neues Sammelrörchen gesetzt und mit offenem Deckel bei höchster Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Abschließend konnte die Säule in ein neues 1,5 ml-Sammeltube gesetzt und die Exosomen-RNA eluiert werden. Hierfür wurden 14 µl RNase-freies Wasser zentral aufpipettiert und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Exosomen-RNA bei - 80 °C aufbewahrt.

2.2.11.3 Exosomen-Isolation (Firma Invitrogen)

Für die alternative Exosomenisolation mithilfe des Kits der Firma Invitrogen wurden bis auf die zur Fixierung benötigten Reagenzien alle Lösungen aus dem Kit verwendet. Zunächst musste der Zellkulturüberstand (Kapitel 2.2.11.1) für 30 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert, in ein neues Cup überführt und mit dem jeweils halben Volumen *Total Exosome Isolation reagent* versetzt werden. Nach gründlichem Mixen erfolgte dann die Inkubation über Nacht bei 4 °C. Etwaige unerwünschte Zell- und Organellreste wurden anschließend für eine Stunde bei 4 °C und 10.000 g abzentrifugiert und als Überstand verworfen. Aus der sich nun im Pellet befindlichen Exosomenfraktion konnte im Folgenden entweder Protein oder RNA extrahiert

werden. Alternativ wurde das Exosomenpellet für die Fixierung und Untersuchung am Elektronenmikroskop vorbereitet.

Für die Proteinisolierung aus den Exosomen-Pellets wurden diese in je 150 µl kaltem *Exosome Resuspension Buffer* resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die so erhaltenen Proteine konnten bis zur weiteren Analyse mittels colorimetrischer Konzentrationsbestimmung (Kapitel 2.2.8.3) oder Western Blot (Kapitel 2.2.10) bei -20 °C aufbewahrt werden.

Für die Fixierung mussten die Pellets stattdessen in je 100 µl 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS resuspendiert werden. Hiervon wurden je 50 µl in ein neues Cup überführt und mit Glutaraldehyd in der Zielkonzentration von 0,1 % der PFA-Konzentration versetzt. Nach einstündiger Zentrifugation bei 10.000 g konnte der Überstand verworfen, das in 20 µl PBS resuspendierte Pellet in ein neues Cup überführt und bis zur Elektronenmikroskopie bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Elektronenmikroskopie wurde vom Kooperationspartner meiner Arbeitsgruppe, Dr. Frank Pfrieger (INSERM, Straßburg), durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse lassen sich thematisch in drei Teile gliedern: Kapitel 3.1 thematisiert die Validierung des Müllerzellisolationsprotokolls. In Kapitel 3.2 sind die Komponenten, welche die Müllerzelle für eine exozytotische Sekretion benötigt, genauer untersucht. Kapitel 3.3 befasst sich näher mit Müllerzellen, in denen Sekretionsgrundlagen deaktiviert wurden sowie den daraus resultierenden Konsequenzen auf histologischer und Nukleinsäureebene.

3.1 Müllerzellisolation aus der Retina

Für alle Müllerzellexperimente dieser Arbeit war ein verlässliches Protokoll zur Müllerzellisolation (Kapitel 2.2.4) Grundvoraussetzung. Deshalb wurde mittels histologischer Analysen und TaqMan®-PCR der Erfolg des Protokolls validiert, um die Aussagekräftigkeit der auf dem Protokoll basierenden weiterführenden Versuche sicherzustellen. Eine Validierung auf Proteinebene mittels Western Blot für den Müllerzell-Marker CD29 war in bisherigen Versuchen leider nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

3.1.1 Histologische Reinheitskontrolle der mittels MACS®-Technik isolierten Müllerzellfraktion

In der histologischen Analyse wurde mithilfe des Programms *ImageJ* nach der Müllerzellisolation einerseits der Anteil der morphologisch intakten Müllerzellen innerhalb der Müllerzellfraktion (Abb. 11A) und andererseits die Verunreinigung der Negativfraktion durch Müllerzellen (Abb. 11B) bestimmt. Im Mittel konnte eine 79,3%ige Reinheit der Müllerzellfraktion und ein Anteil von 0,5 % Müllerzellen in der neuronalen Fraktion erreicht werden, wobei die Reinheit der Müllerzellfraktion mit der Anzahl der Versuche stieg (Tab. 15), was auf den Trainingseffekt und die große Bedeutung des richtigen Handlings der Zellen schließen ließ.

Tabelle 15: Reinheit der Müllerzellfraktion nach Isolation aus der Retina mittels MACS®-Technik

Versuchsnummer	Müllerzellen in der Müllerzellfraktion [%]	Müllerzellen in der Neuronenfraktion [%]
1	63,2	0,1
2	68,9	0,2
3	88,5	1,2
4	72,7	0,4
5	88,2	0,3
6	94,6	0,7
Mittelwert \pm SEM: 79,3 \pm 5,2		Mittelwert \pm SEM: 0,5 \pm 0,2

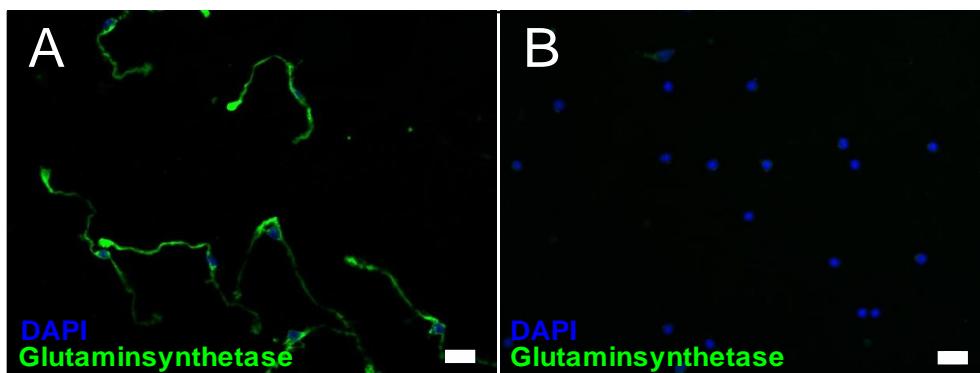


Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopie der Zellfraktionen nach Isolation aus der Retina mittels MACS®-Technik. Glutaminsynthetase diente als Marker für Müllerzellen. Die Kerne aller in der Probe befindlicher Zellen wurden durch eine DAPI-Färbung dargestellt. (A) Müllerzellfraktion; (B) Neuronenfraktion. Größenstandard: 20 µm.

3.1.2 TaqMan®-PCR zur Validierung des MACS®-Protokolls zur Anreicherung retinaler Zelltypen

Auf dem Boden eben beschriebener histologischer Analysen wurde das Protokoll zur Müllerzellisolation weiterentwickelt: In der finalen Version des Protokolls (Kapitel 2.2.4) wurden aus dem Zellpool der Retina nacheinander Mikroglia, Endothel- und Müllerzellen isoliert, sodass die verbliebene Suspension weitgehend von nicht-neuronalen Zellen befreit war und vor allem Neuronen enthielt. Als Kontrolle der Effektivität des Protokolls auf Nukleinsäure (mRNA) -Ebene diente eine quantitative TaqMan®-PCR, bei der die einzelnen Zellfraktionen auf die Expression Zelltyp-spezifischer Gene untersucht wurden (Abb. 12).

Für Mikroglia bzw. Makrophagen ist CD11b (*Cluster of Differentiation 11b*) ein geeignetes Markergen (Lim et al. 2013). Im Vergleich zur Mikrogliafraktion zeigte sich die Neuronenfraktion fast gänzlich frei von CD11b-Transkripten und damit im Umkehrschluss von Mikroglia. Dies schien auch für die Müllerzell-Fraktion zu gelten, wobei jedoch für die Müllerzell-Population nur eine kleinere Versuchszahl verwendet und deshalb kein signifikanter Unterschied erzielt werden konnte.

Als Marker für Müllerzellen kann Glutaminsynthetase verwendet werden (Ko, Nobutake, Masao 1999). Wie erwartet wies die Müllerzellfraktion eine signifikant vielfach höhere Expression von Glutaminsynthetase als die Neuronen- und Mikrogliafraktion auf.

Das Gen Nrl (*Neural retina-specific leucine zipper protein*) ist in den Photorezeptoren der Retina zu finden (Farjo et al. 1993). Die Expression von Nrl war wie zu erwarten signifikant

am höchsten in der Neuronenfraktion, wobei eine geringe Verunreinigung der Mikrogliafraktion durch Neuronen vorzuliegen schien (Abb.12).

Für die Endothelzellen wurde die Expression des Markergens *Icam2* (*Intercellular Adhesion Molecule 2*) untersucht (Wang et al. 2019). Wie erwartet war dessen verhältnismäßige Expression in den Endothelzellen am höchsten. Dies galt in besonderem Maße im Vergleich zu den Neuronen, aber auch zu den Mikrogliazellen. Es ist jedoch zu beachten, dass zwischen Endothel- und Müllerzellen kein signifikanter Expressionsunterschied bestand. Dies deutete darauf hin, dass einige Endothelzellen während der Isolationsschritte in die Müllerzellfraktion gelangt sein könnten oder aber, dass Müllerzellen selbst zu einem gewissen Maße *Icam2* exprimieren.

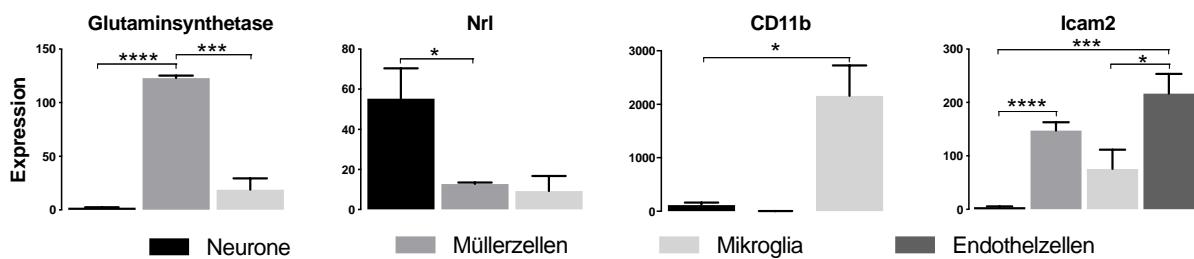


Abbildung 12: Validierung der Anreichung der aus Retina isolierten Zellpopulationen mittels quantitativer PCR für Zelltyp-spezifische Marker. Für CD11b, Glutaminsynthetase und *Nrl* wurde das Protokoll für die Isolation von Neuronen, Müllerzellen und Mikroglia verwendet. Für *Icam2* wurden zusätzlich Endothelzellen isoliert. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von $n = 3$ (Glutaminsynthetase, *Nrl*, CD11b; Ausnahme: $n = 2$ für CD11b in Müllerzellen) bzw. $n = 5$ (*Icam2*; Ausnahme: $n = 4$ für *Icam2* in Müllerzellen) unabhängigen Versuchen wieder. Einfaktorielle Varianzanalyse nach Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

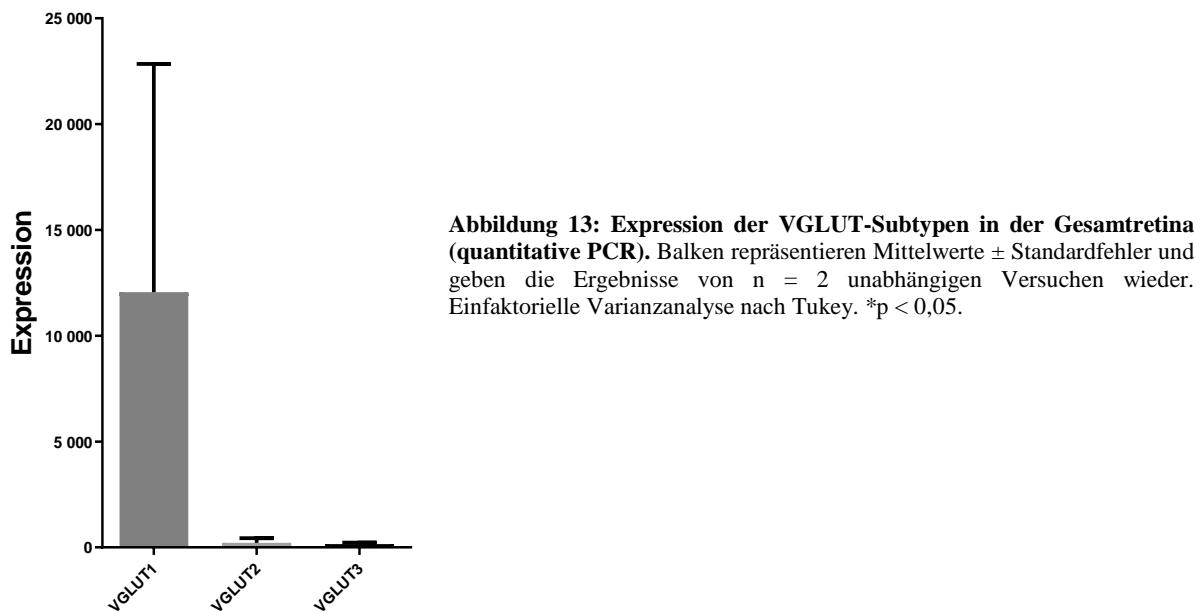
3.2 Analyse der molekularen Grundlagen für Gliotransmission in Müllerzellen

Ein besseres Verständnis für die Funktion von Müllerzellen in der gesunden und krankhaft veränderten Netzhaut könnte neue Impulse für die Therapieentwicklung retinaler und neurologischer Erkrankungen und auch für neurowissenschaftliche Fragestellungen liefern. In meiner Doktorarbeit lag der Fokus auf der Untersuchung der molekularen Grundlagen für sekretorische Aktivität von Müllerzellen. Zu diesem Zweck wurden sie auf das Vorhandensein der dafür benötigten vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMPs), vesikulären Transmittertransporter (VGLUTs) und Exosomen (Kapitel 1.3) untersucht.

3.2.1 Expression von vesikulären Glutamat-Transportern (VGLUTs) in der Retina

VGLUTs stellen eine Grundlage für Sekretionsmechanismen in Zellen dar, da sie für die Aufnahme und das Speichern von L-Glutamat in intrazelluläre Vesikel zuständig sind (Kapitel 1.3.2). Zunächst wurde die Expression der drei VGLUT-Subtypen in der Gesamtretina mittels quantitativer PCR untersucht. Transkripte aller drei VGLUT-Subtypen konnten in der

Retina nachgewiesen werden (Abb. 13). Die Expression von VGLUT1 schien zwar die von VGLUT2 und VGLUT3 zu übersteigen, bei einer Versuchsanzahl von $n = 2$ ergab sich allerdings kein signifikanter Unterschied. Entsprechend wurde von einer weiterführenden Interpretation der Expressionsunterschiede abgesehen.



Interessant war nun die Frage, in welchen Zelltypen der Retina die einzelnen VGLUTs zu finden sind (Abb. 14). VGLUT1 wurde in beiden untersuchten Zellpopulationen exprimiert, wobei die Expression in Müllerzellen signifikant geringer war als in der Neuronenfraktion. VGLUT2 konnte in beiden Fraktionen verhältnismäßig etwa gleich stark exprimiert nachgewiesen werden. Allerdings zeigte VGLUT3 eine zehnmal höhere Expression in Müllerzellen als in der neuronalen Fraktion. Aufgrund dieses interessanten Expressionsmusters wurde VGLUT3 im weiteren Verlauf detaillierter im transgenen Mausmodell analysiert (Kapitel 3.3.5). Eine Bestätigung dieser Aussage mittels Nachweis von VGLUT3 auf Proteinebene im Western Blot war bisher leider mangels ausreichend spezifischer bzw. sensitiver Antikörper nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

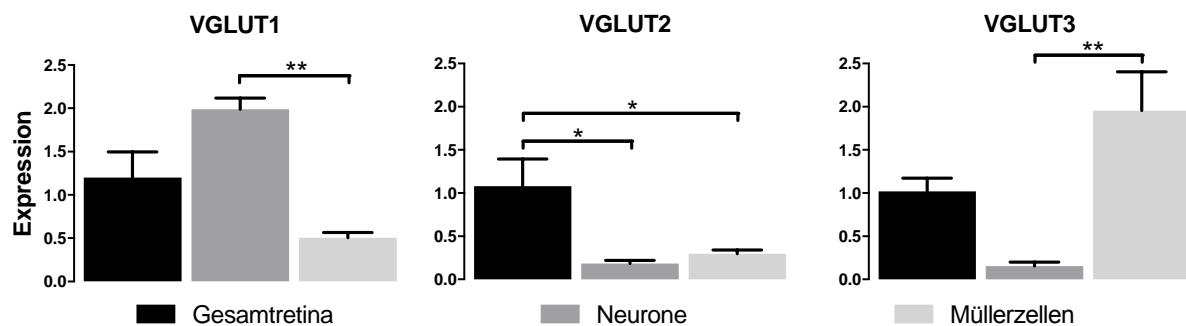


Abbildung 14: Expression der VGLUT-Subtypen in den unterschiedlichen retinalen Zellpopulationen (quantitative PCR). Hier wurde das Isolationsprotokoll für die Isolation von Neuronen und Müllerzellen verwendet. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von $n = 5$ (VGLUT2, VGLUT3) bzw. $n = 3$ (VGLUT1) unabhängigen Versuchen wieder. Einfaktorielle Varianzanalyse nach Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Insgesamt schienen Müllerzellen damit alle drei VGLUT-Subtypen zu exprimieren, wobei VGLUT1 vor allem in Neuronen, VGLUT3 primär in Müllerzellen, und VGLUT2 in beiden Fraktionen etwa gleich verteilt vorzukommen schien.

3.2.2 Charakterisierung von Vesikel-assozierten Membranproteinen (VAMPs) in der Retina

Die zweite untersuchte molekulare Grundlage für sekretorische Aktivität von Müllerzellen sind die VAMPs (Kapitel 1.3.1). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die hierzu bereits bestehende Forschung meiner Arbeitsgruppe weiterzuführen. VAMPs sind ein wichtiges Hilfsmittel der Müllerzelle zur exozytotischen Sekretion und Kommunikation mit dem umliegenden Gewebe, da sie durch Interaktion untereinander die Fusion von Membranen einleiten. Darum war es einerseits von essentieller Bedeutung, ob und in welchen Zellen die unterschiedlichen VAMP-Subtypen in der Netzhaut exprimiert wurden (Kapitel 3.2.2.1 und Kapitel 3.2.2.2), welche Proteine mögliche Interaktionspartner waren (Kapitel 3.2.2.3) und wo VAMPs innerhalb der Müllerzelle lokalisiert waren (Kapitel 3.2.2.4). Andererseits sollte in weiterführenden Experimenten (Kapitel 3.3) die Frage beantwortet werden, wie die Netzhautzellen und insbesondere Müllerzellen auf einen Funktionsverlust von einzelnen VAMPs reagierten.

3.2.2.1 VAMP-Expressionsanalyse mittels quantitativer TaqMan®-PCR

Zunächst wurde die Verteilung der einzelnen VAMPs in den Zellfraktionen der Retina der Wildtyp-Maus ermittelt (Abb. 15).

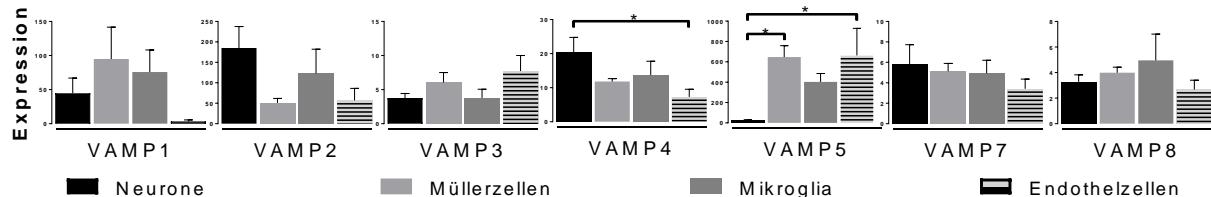


Abbildung 15: Expression der einzelnen VAMPs in den unterschiedlichen retinalen Zellpopulationen (quantitative PCR). Hier wurde das Isolationsprotokoll für die Isolation von Neuronen, Müllerzellen, Mikroglia und Endothelzellen verwendet. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von $n = 6$ (Ausnahmen: $n = 4$ für VAMP1 in Neuronen und Müllerzellen, $n = 2$ für VAMP1 in Mikroglia und Endothelzellen, $n = 5$ für VAMP3 in Mikroglia) unabhängigen Versuchen wieder. Einfaktorielle Varianzanalyse nach Tukey. * $p < 0,05$.

Es fiel auf, dass VAMP4 signifikant seltener in Endothelzellen exprimiert wurde als in Neuronen. Interessant war außerdem, dass VAMP5 vor allem in Müllerzellen und Mikroglia exprimiert war. Hier lag eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu Neuronen vor. Für alle anderen VAMPs ließen sich zwar Tendenzen feststellen, diese zeigten jedoch in dieser Versuchsreihe - auch aufgrund kleiner Versuchszahlen - jeweils keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Retina.

Hierbei muss angemerkt werden, dass eine Normalisierung der Daten auf ein *housekeeping*-Protein nicht möglich war, da trotz mehrerer Experimente bisher kein geeignetes *housekeeping*-Gen in meiner Arbeit etabliert werden konnte.

3.2.2.2 Darstellung von VAMP3, VAMP5 und VAMP7 mittels Western Blot

Neben einer Untersuchung der VAMPs auf mRNA-Ebene erfolgte ihre Darstellung auch auf Proteinebene mithilfe von Western Blots. Hierfür wurden aufgrund der soeben vorgestellten Ergebnisse und früherer Versuche meiner Arbeitsgruppe VAMP3, VAMP5 und VAMP7 ausgewählt, da für diese Gene eine spezifische Expression in Müllerzellen vermutet wurde. Die Etablierung eines Western Blot-Protokolls zum Nachweis dieser Proteine war Teil meiner Dissertation und Bestandteil umfangreicher Versuchsreihen.

Insgesamt ist anzumerken, dass sich das Anfertigen der Western Blots für diese SNARE-Proteine äußerst schwierig gestaltete. Zunächst wurde die Gelelektrophorese in unterschiedlichen Gelen getestet. Zusammengefasst erwies sich ein höherprozentiges Gel (15 %) als effektiver als ein 12%iges Gel (Kapitel 2.2.10.2). Außerdem wurden sowohl Wet-Blotting auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran als auch Semidry-Blotting auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran getestet (Kapitel 2.2.10.3), wobei insgesamt mithilfe des Semidry-Blottings bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Für die Inkubationslösungen der jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper sowie die Blockier- und Waschlösungen wurden

eine Vielzahl von Reagenzien und Protokollen erprobt. Das letztlich etablierte Protokoll mit den am besten funktionierenden Konditionen ist in Tabelle 14 des Methodenteils (Kapitel 2.2.10.4) dargestellt.

Die Proteine VAMP3, VAMP5 und VAMP7 konnten schließlich qualitativ in der Gesamtretina dargestellt werden (Abb. 16). Für VAMP5 war zusätzlich zur Veranschaulichung in der Gesamtretina eine qualitative Darstellung in der Müllerzellfraktion möglich (quantitative Versuche wurden bisher nicht durchgeführt). Dies passte zu den Ergebnissen der aufgeführten Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene, in denen VAMP5 besonders in Müllerzellen exprimiert war (Kapitel 3.2.2.1).

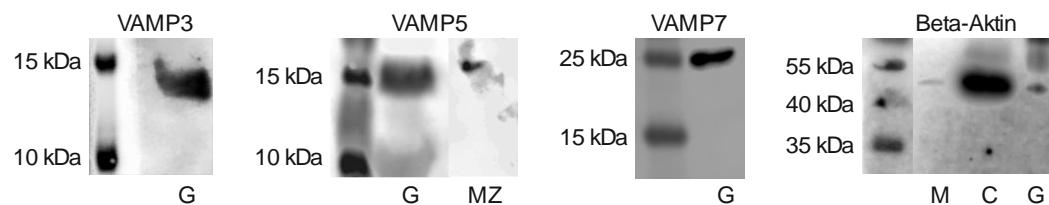


Abbildung 16: Western Blots für VAMP3 (Größe ca. 11 kDa; Proteinstandard und 15 µg Extrakt aus Gesamtretina, Entwicklungsdauer 00:30 min., Proteinisolierung nach 2.2.8.1), **VAMP5** (Größe ca. 11 kDa; Proteinstandard und Extrakt aus Gesamtretina sowie aus der Müllerzellfraktion, Entwicklungsdauer 10 min., Müllerzellisolierung nach 2.2.4 mit VAMP5-IP-Antikörper nach 2.2.9, Proteinisolierung nach 2.2.8.1), **VAMP7** (Größe ca. 25 kDa; Proteinstandard und Extrakt aus Gesamtretina, Entwicklungsdauer 10 min., Proteinisolierung nach 2.2.8.1 mit VAMP7-IP-Antikörper nach 2.2.9) und **Beta-Aktin** (Größe ca. 42 kDa; Proteinstandard, 4 µg Membranprotein, 21 µg zytosolische Proteine und 28 µg Gesamtretinaprotein, Entwicklungsdauer 10:30 min., Gesamtproteinisolierung nach 2.2.8.1, Membranproteinisolierung nach dem Standardprotokoll in 2.2.8.2). Die jeweiligen Western Blot-Konditionen sind in Kapitel 2.2.10 dargestellt. G: Gesamtretina; MZ: Müllerzellfraktion; M: Membranproteine; Z: zytosolische Proteine.

Für weiterführende Western Blot-Versuche zum gezielten Proteinnachweis in aus der Netzhaut isolierten Membranproteinen wurden zunächst die beiden in Kapitel 2.2.8.2 gezeigten Protokolle zur Membranproteinisolierung miteinander verglichen. Da sich das Standardprotokoll bezüglich der Membranfraktion im einmaligen Vergleich als effektiver (Tab. 16) und schneller erwies, wurde im Folgenden dieses für Western Blot-Versuche mit Membranproteinen verwendet. Ziel war die Darstellung von VAMPs in der Membranproteinfraktion.

Tabelle 16: Vergleich der zwei verwendeten Methoden zur Membranproteinisolierung anhand der durchschnittlich pro Retina erzielten Proteinkonzentration. Verglichen wurde ein Standard-Protokoll mit dem *Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit* der Firma ThermoFisher Scientific (Kapitel 2.2.8.2) mit n = 1, die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels colorimetrischer Konzentrationsbestimmung nach Bradford im *Varioskan™ Flash Multimode Reader* (Kapitel 2.2.8.3).

	Membranfraktion Standardprotokoll	Membranfraktion Mem-PER™-Kit	Zytosolfraktion Standardprotokoll	Zytosolfraktion Mem-PER™-Kit
Proteinkonzentration in µg/ml	221,8	122,0	152,2	151,8

Leider lieferten die Western Blots hierzu keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Hierbei ist anzumerken, dass sich mittels Beta-Aktin-Blot durchaus eine qualitative

Ladung der Membran- und Zytosolfraktion in alle Taschen sowie eine korrekte Übertragung der Proteine auf die Membran während des Western Blotting nachweisen ließ (Abb. 16).

Versuche mit den Proteinen NDRG1 (*N-myc downstream regulated gene 1*) und EIF4A1 (*Eukaryotic initiation factor 4A-I*) zur Etablierung eines neuen *housekeeping*-Proteins als Vorbereitung auf quantitative Proteinnachweise waren ebenso bisher nicht zielführend.

3.2.2.3 Immunpräzipitation zur Identifikation von Interaktionspartnern Müllerzell-spezifischer VAMPs

Da Müllerzellen entsprechend meiner Expressionsdaten auf Transkriptebene besonders spezifisch VAMP3, VAMP5 und VAMP7 exprimierten, war es von Interesse, Interaktionspartner dieser VAMP-Subtypen zu identifizieren, um mehr über ihre Aufgaben in der Zelle zu erfahren. Aus diesem Grund führte ich mit Antikörpern gegen VAMP3, VAMP5 und VAMP7 jeweils ein Set an Immunpräzipitationsexperimenten mit Proteinextrakten der Gesamtnetz haut durch. Basierend auf einem derartigen Datensatz sollten erste Rückschlüsse auf die potentielle Lokalisation der verschiedenen VAMPs innerhalb der Müllerzelle und deren Beteiligung an Transportprozessen bzw. Zellfunktionen möglich werden. Die massenspektrometrischen Analysen der Immunpräzipitationsexperimente wurden von der Kollaborationspartnerin meiner Arbeitsgruppe, Dr. Stefanie Hauck (HelmholtzZentrum München, Protein Unit), durchgeführt. Während wir keine spezifische Detektion von VAMP3 und VAMP7 durch den jeweiligen Antikörper nachweisen konnten (Daten nicht gezeigt), fanden wir eine hochspezifische Detektion von VAMP5 durch den Kaninchen-Anti-VAMP5-Antikörper der Firma Synaptic Systems, Göttingen. Die Pathway-Enrichment-Analyse der bis auf wenige Ausnahmen mindestens zweifach ko-präzipitierten Proteine ergab die in Tabelle 17 aufgeführten signifikanten Anreicherungen. Die jeweiligen Genfunktionen sind ebenfalls in der Tabelle aufgeführt.

Tabelle 17: Daten der massenspektrometrischen Analyse der Immunpräzipitation in Gesamtretina mit dem VAMP5-Antikörper im Vergleich zu einer unspezifischen Isotyp-Kontrolle. Es sind alle ko-präzipitierten Proteine bis einschließlich einer VAMP5/IgG-Ratio von 2,0 aufgeführt sowie ausgewählte Proteine mit einer VAMP5/IgG-Ratio < 2. Fett markierte Gennamen werden im Diskussionsteil (Kapitel 4.3.2) aufgegriffen (STRING Protein-Protein interaction networks; Szklarczyk et al. 2017).

Genname	Konfidenz-wert	Verhältnis VAMP5/IgG	Proteinname und Genfunktion
Vamp5	41	infinity	
Eif6	20	1052,8	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i> Biogenese von Ribosomen, Zellexporte, wichtige Komponente von Hemidesmosomen
Mvb12b	25	649	<i>Multivesicular body subunit 12B</i> Komponente des <i>ESCRT-I</i> -Komplexes, ein Regulator vesikulärer Transportprozesse; benötigt für die Sortierung endozytotischer, Ubiquitin-markierter Partikel in multivesikuläre Körperchen (Kapitel 1.3.3)
Impdh1	53	20,4	<i>Inosine 5'-phosphate dehydrogenase 1</i> Regulation von Zellwachstum (wichtig bei der De-Novo-Synthese von Guanin-Nukleotiden)
Rps15	24	19,5	<i>Ribosomal protein S15</i> Ribosomales Protein
Tubb4a	494	14,7	<i>Tubulin, beta-4A chain</i> Bestandteil von Mikrotubuli; Mutationen führen zu Leukodystrophie 6 oder autosomal-dominanter Torsionsdystonie 4
Hbb-y	46	13,9	<i>Hemoglobin Y, beta-like embryonic chain</i> Epsilon-Kette des Hämoglobins
Pgrmc1	24	13,7	<i>Progesterone receptor membrane component 1</i> Progesteron-Rezeptor
Cct2	108	12,3	<i>Chaperonin containing Tcp1, subunit 2 (beta)</i> Molekulares Chaperon; spielt vermutlich eine Rolle beim Aufbau des BBSome-Proteinkomplexes, der in der Ziliogenese als Bestandteil des Transportsystems den Zilien Vesikel zuführt
Nufip2	55	10,9	<i>Nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2</i> Bindet RNA
Gm5414	142	9,7	<i>Predicted gene 5414</i> Möglicherweise Zusammenhang mit Intermediärfilamenten/Keratin (National Center for Biotechnology Information (NCBI))
mt-Atp8	28	9,4	<i>Mitochondrially encoded ATP synthase 8</i> ATP-Synthase
Akap8	34	9,2	<i>A-kinase (PRKA) anchor protein 8</i> Ankerprotein, das die Kompartimentierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA Typ II) vermittelt
Sv2a	39	7,8	<i>Synaptic vesicle glycoprotein 2 a</i> Kontrolle regulierter Sekretion in neuronalen und endokrinen Zellen; verstärkt selektiv niederfrequente Neurotransmission und reguliert Vesikelfusionierung, indem es den zur Sekretion vorbereiteten Pool sekretorischer Vesikel aufrechterhält
Zfr	51	7,7	<i>Zinc finger RNA binding protein</i> Involviert in Postnidations- und Gastrulationsphasen der Embryogenese

Atp1b2	69	7,6	<i>ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide</i> Nicht-katalytische Komponente der ATPase
Tmpo	78	6,9	<i>Thymopoietin</i> Möglicherweise involviert in die strukturelle Organisation des Nukleus; wichtig für die nukleäre Verankerung von RB1 (<i>RB Transcriptional Corepressor 1</i> , Retinoblastom-Gen)
Smarca2	53	5,1	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2</i> Coaktivator in der Transkription, kooperiert mit nukleären Hormonrezeptoren, um die transkriptionale Aktivierung zu potenzieren
Rpl18a	39	3,9	<i>Ribosomal protein L18A</i> Ribosomales Protein
Rab5b	47	3,7	<i>Ras-related protein Rab-5B (RAS oncogene family)</i> Teil der RAS-Onkogen-Familie, beteiligt am Proteintransport, wahrscheinlich involviert in vesikuläre Transportprozesse
Map6	85	3,6	<i>Microtubule-associated protein 6</i> Involviert in die Mikrotubuli-Stabilisierung in vielen Zellen, einschließlich Neuronen; Regulation lysosomaler Transportprozesse in der dendritischen Morphogenese
Snx18	40	3,5	<i>Sorting nexin 18</i> Wahrscheinlich involviert in verschiedene Stadien intrazellulärer Transportprozesse
Ctnnb1	68	3,5	<i>Catenin (cadherin associated protein), beta 1</i> Dem Wnt-Signalweg (Signaltransduktionsweg, durch den die Zelle auf äußere Signale reagieren kann) nachgeschaltete Schlüsselkomponente (Wirkung je nach Signal, z. B. Coaktivator von Transkriptionsfaktoren)
Snrfp	20	3,3	<i>Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F</i> Kernstück von Ribonukleoproteinen des Spleißosoms
Rpl9	29	3,3	<i>Ribosomal protein L9</i> Ribosomales Protein
Rpl35a	49	3,3	<i>Ribosomal protein L35A</i> Ribosomales Protein
Hnrnph2	432	3,3	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2</i> Komponente des hnRNP-Komplexes (dieser ist ein Ribonukleoprotein)
Dynll1	28	3,2	<i>Dynein light chain LC8-type 1</i> Komponente des zytoplasmatischen Dynein-1-Komplexes (reguliert die Dynein-Funktion), Motor für intrazelluläre retrograde Motilität von Vesikeln und Organellen entlang von Mikrotubuli
Gucy2e	47	3,2	<i>Guanylate cyclase 2e</i> Guanylatcyclase
Gphn	59	3,1	<i>Gephyrin</i> Ankerprotein für Glycinrezeptoren an subsynaptischen Mikrotubuli-Einheiten; interagiert vermutlich mit Neurotransmitterrezeptoren und ist beteiligt an deren Anordnung in bestimmten Membranbereichen; außerdem benötigt für die Synthese eines Cofaktors, der molybdän-abhängige Enzyme reguliert (Fritschy et al. 2008)
Skp1a	47	3	<i>S-phase kinase-associated protein 1A</i> Wichtige Komponente des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (vermittelt die Ubiquitinierung von Proteinen, die in Zellzyklus, Signaltransduktion und Transkription involviert sind)

Rps6	162	3	<i>Ribosomal protein S6</i> Ribosomales Protein für Zellwachstum und -proliferation
Rps9	25	2,9	<i>Ribosomal protein S9</i> Ribosomales Protein
Gnb2l1	41	2,7	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 like 1</i> Involviert in die Rekrutierung, Gruppierung und Regulierung vieler Signalmoleküle; interagiert mit sehr vielen Proteinen und spielt eine Rolle in vielen zellulären Prozessen
Smarcd1	42	2,7	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 1</i> Involviert in die Umformung von Chromatin; starker Einfluss auf Vitamin-D-vermittelte transkriptionale Aktivität
Polr2h	95	2,7	<i>Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H</i> Komponente der DNA-abhängigen RNA-Polymerase I-III
Cox7a2	48	2,6	<i>Cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2</i> Teil der Cytochrom-C-Oxidase (Oxidase im mitochondrialen Elektronentransport)
Ssbp3	73	2,6	<i>Single-stranded DNA binding protein 3</i> Wahrscheinlich involviert in die Transkription des Alpha2-Kollagen-Gens
Tfap2a	27	2,5	<i>Transcription factor AP-2, alpha</i> Transkriptionsregulator
Rps11	32	2,5	<i>Ribosomal protein S11</i> Ribosomales Protein
Rps23	41	2,5	<i>Ribosomal protein S23</i> Ribosomales Protein
Reep5	46	2,5	<i>Receptor accessory protein 5</i> Möglicherweise involviert in die Expression olfaktorischer Rezeptoren
Slc25a12	69	2,5	<i>Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12</i> Katalysator des Kalzium-abhängigen Austauschs zytoplasmatischen Glutamats mit mitochondrialem Aspartat an der inneren mitochondrialen Membran
Mecp2	180	2,5	<i>Methyl CpG binding protein 2</i> Chromosomales Protein, das methylierte DNA bindet
Cryba1	20	2,4	<i>Crystallin, beta A1</i> Dominantes Strukturprotein der Augenlinse
Rbm17	20	2,3	<i>RNA binding motif protein 17</i> Spleiß-Faktor
Ndufa5	27	2,3	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5</i> Untereinheit der NADH-Dehydrogenase der mitochondrialen Atmungskette
Cystm1	33	2,3	<i>cysteine-rich transmembrane module containing 1</i> Vermutlich ein Ankerprotein (Venancio und Aravind 2010)
Clt	94	2,3	<i>Clathrin, light polypeptide</i> Teil des Clathrin-Moleküls
Ssb	228	2,3	<i>Sjogren syndrome antigen B</i> Bindet an RNA-Polymerase-III-Transkripte, schützt sie vor Exonuklease-Verdau, erleichtert deren Faltung und Reifung

Scamp5	24	2,2	<i>Secretory carrier membrane protein 5</i> Benötigt für die Kalzium-abhängige Exozytose von Zytokinen, arbeitet wahrscheinlich in Kooperation mit der SNARE-Maschinerie
St13	42	2,2	<i>Suppression of tumorigenicity 13</i> Möglicherweise ein Tumorsuppressorgen, beteiligt an der Zusammenführung einzelner Komponenten von Hitzeschockproteinen
Sec23b	138	2,2	<i>Protein transport protein Sec23B</i> Komponente des Coat Protein Complex II (COPII), der die Formation von Vesikeln aus der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und die Selektion von Transportmolekülen für ihren Transport zum Golgikomplex vermittelt
Lancl2	23	2,1	<i>LanC (bacterial lantibiotic synthetase component C)-like 2</i> Benötigt für Signalwege in Granulozyten
Zmiz1	32	2,1	<i>Zinc finger, MIZ-type containing 1</i> Erhöht die transkriptionale Aktivität von Androgenrezeptoren
Ndrg1	43	2,1	<i>N-myc downstream regulated gene 1</i> Stress-abhängiges Protein, das in Hormonantworten, Zellwachstum und -differenzierung involviert ist; Tumorsuppressor in vielen Zelltypen; außerdem Regulator der Mikrotubulidynamik, spielt eine Rolle bei Transportprozessen in der Zelle
Capza2	54	2,1	<i>Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2</i> F-Aktin Capping Protein, bindet Kalzium-unabhängig an Aktinfilamente
Syne1	60	2,1	<i>Nuclear envelope spectrin repeat protein 1/ Nesprin-1</i> Hält die zelluläre räumliche Organisation zwischen Organellen und Aktin-Zytoskelett aufrecht
Rpl10	89	2,1	<i>Ribosomal protein L10</i> Ribosomales Protein
Cnn3	123	2,1	<i>Calponin 3, acidic</i> Filament-assoziiertes Protein, das an der Regulation und Modulation von Kontraktionen glatter Muskulatur beteiligt ist
Tox4	25	2	<i>TOX high mobility group box family member 4</i> Komponente des PTW/PP1-Phosphatasekomplexes, kontrolliert während des Übertritts aus der Mitose in die Interphase Chromatinstruktur und Zellzyklus
Aldh2	25	2	<i>Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial</i> Umwandlung von Retinaldehyd in Retinsäure (Teil des Rhodopsin-Moleküls)
Hint1	34	2	<i>Histidine triad nucleotide binding protein 1</i> Hydrolysiert Purinnukleotide
Snrnd3	37	2	<i>Small nuclear ribonucleoprotein D3;</i> Kernstück von Ribonukleoproteinen des Spleißosoms
Khdrbs3	40	2	<i>KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3</i> RNA-bindendes Protein, spielt eine Rolle in der Regulation von alternativem Spleißen
Impdh1	59	2	<i>Inosine 5'-phosphate dehydrogenase 1</i> Reguliert Zellwachstum durch Katalyse der Konversion von Inosin-5'-Phosphat (IMP) zu Xanthosin-5'-Phosphat (XMP) (erster Schritt der De-Novo-Synthese von Guaninnukleotiden)

Ssbp2	74	2	<i>Single-stranded DNA binding protein 2</i> Bindet DNA, Regulator der Transkription
Ablim1	221	2	<i>Actin-binding LIM protein 1</i> Könnte als Gerüstprotein dienen, möglicherweise beteiligt an der Retinaentwicklung und Axon-Lenkung
Sec24b	167	1,6	<i>Sec24 related gene family, member B (S. cerevisiae)</i> Vermutlich Komponente des Coat Protein Complex II (COPII), der die Formation von Vesikeln aus der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und die Selektion von Transportmolekülen für ihren Transport zum Golgikomplex vermittelt
Syp	68	1,5	<i>Synaptophysin</i> Möglicherweise benötigt für die Organisation von Membrankomponenten und die Zielführung von Vesikeln zur Plasmamembran; involviert in synaptische Plastizität
Sept7	85	1,5	<i>Septin 7</i> Benötigt für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, involviert in Mitose und Zellteilung, Ziliogenese, Zellbewegung
Nsf	388	1,5	<i>N-ethylmaleimide sensitive fusion protein</i> ATPase, benötigt für Vesikel-vermittelten Transport (Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und Katalyse der Fusion der Transportvesikel mit dem Golgikomplex)
Sec24c	203	1,4	<i>Sec24 related gene family, member C (S. cerevisiae)</i> Vermutlich Komponente des Coat Protein Complex II (COPII)
Stx1b	57	1,4	<i>Syntaxin 1B</i> Potentiell involviert in das Docking synaptischer Vesikel an der präsynaptischen Membran; könnte die Kalzium-abhängige Exozytose in Spermien regulieren
Snap91	56	1,4	<i>Synaptosomal-associated protein 91 = Clathrin coat assembly protein AP180</i> Komponente des Komplexes, der Clathrin mit Rezeptoren in Coated Vesicles verbindet; interagiert vermutlich mit zytoplasmatischen Ketten von Membranproteinen
Sec23a	304	1,3	<i>Sec23 related gene family, member A (S. cerevisiae) = Protein transport protein Sec23A</i> Komponente des Coat Protein Complex II (COPII)
Cplx4	192	1,0	<i>Complexin 4</i> Reguliert einen späten Schritt in der Exozytose synaptischer Vesikel
Sec31a	150	0,8	<i>Sec31 related gene family, member A (S. cerevisiae) = Protein transport protein Sec31A</i> Komponente des Coat Protein Complex II (COPII)
Sec31b	13	0,7	<i>Sec31 related gene family, member B (S. cerevisiae) = Protein transport protein Sec31B</i> Komponente des Coat Protein Complex II (COPII), könnte eine Rolle in der Vesikel-Knospung und dem Export von Molekülen aus dem Endoplasmatischen Retikulum spielen
Syncrip	255	0,7	<i>Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein = Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i> Involviert in mRNA-Prozessierung
Syt1	139	0,5	<i>Synaptotagmin I</i> Vermutlich Regulator von Membraninteraktionen während des Transports synaptischer Vesikel

Es bot sich an, den erhaltenen Datensatz mit einer Proteindatenbank (hier: *STRING*), die Informationen über Proteininteraktionen aus Experimenten, anderen Datenbanken und am Computermodell berechneten Interaktionsvorhersagen enthält, zu vergleichen (*STRING* Protein-Protein interaction networks; Szklarczyk et al. 2017). Dabei fiel zum einen auf, dass das aus den Immunpräzipitationsanalysen erhaltene Proteinnetzwerk signifikant mehr Interaktionen enthielt als erwartet (Pathway-Enrichment-Analyse p-Wert: $1,35e^{-0,8}$). Einige bzw. die meisten der hier aufgeführten ko-präzipitierten Proteine und somit möglichen Interaktionen sind also vermutlich so noch nicht beschrieben oder berechnet worden (Abb. 17). Betrachtete man andererseits die Genfunktionen der ko-präzipitierten Proteine bezüglich zellulärer Komponenten, ergaben sich die in Tabelle 18 aufgeführten Ergebnisse. Besonders interessant war, dass diese einige Proteine aus den Interaktionsfeldern Exosomenfreisetzung, Regulation vesikulärer Transportprozesse und Mikrotubuli-assozierte Proteine beinhaltete.

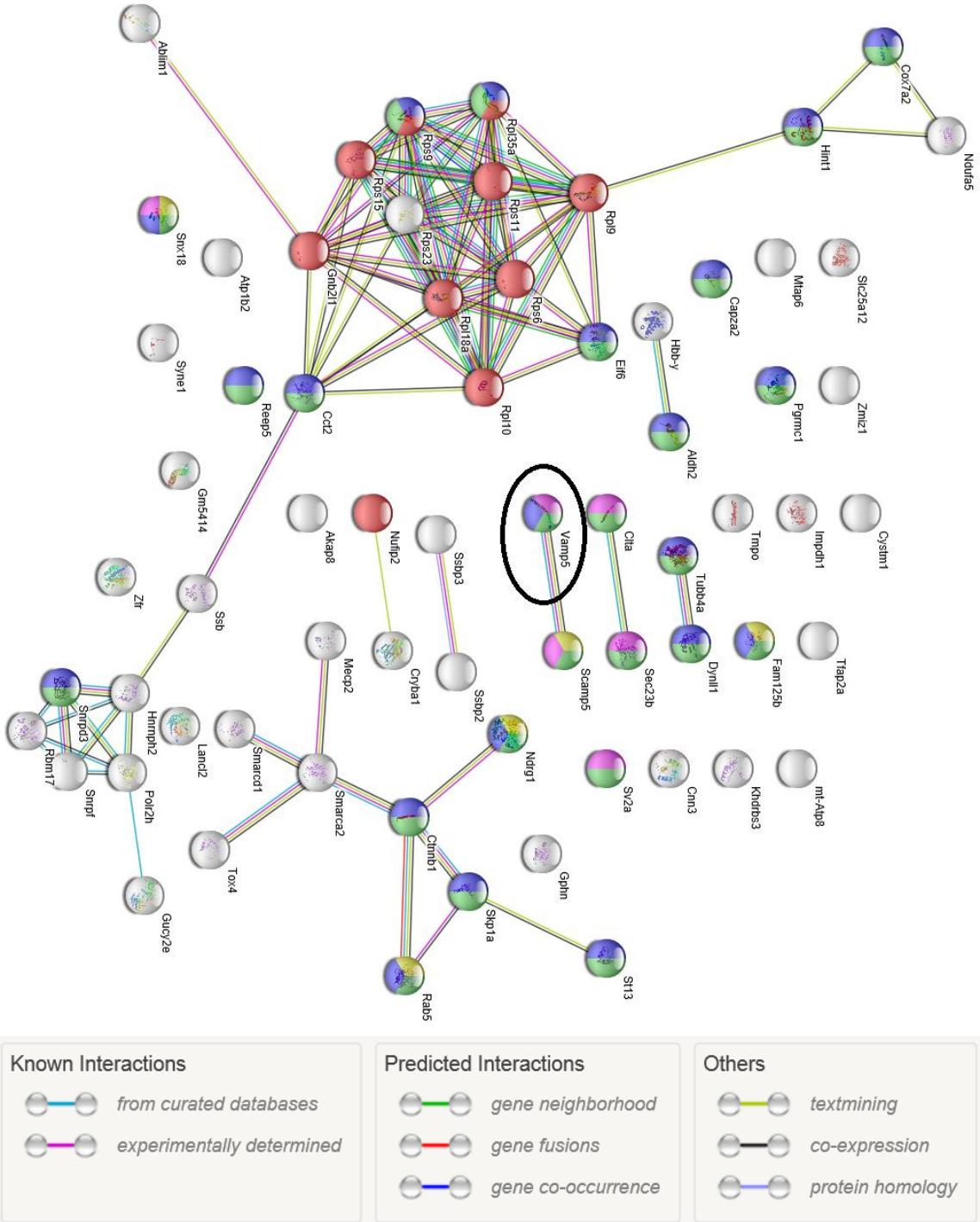


Abbildung 17: Graphische Darstellung der in der Immunpräzipitation mit VAMP5 ko-präzipitierten Proteine. Farbliche Kennzeichnung der Proteine nach Zugehörigkeit zu einzelnen ausgewählten Funktionen im zellulären Aufgabenbereich (rot: Ribosomaler Signalweg; grün: Membran-gebundene Vesikel; blau: extrazelluläre Exosomen; pink: zytoplasmatischer Vesikelanteil, gelb: Endosomenmembran); farbliche Kennzeichnung der vorhergesagten Interaktionen zwischen den Proteinen je nach Quelle, aus der die Interaktionen abgeleitet wurden (Farberklärung siehe Abbildung; STRING Protein-Protein interaction networks; Szklarczyk et al. 2017).

Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der mit VAMP5 präzipitierten Proteine am Beispiel zellulärer Komponenten mit zugehöriger Signalweg-ID, Anzahl Zählungen im Datensatz und farblicher Markierung (bezüglich der Farben siehe auch Abb. 17; STRING Protein-Protein interaction networks; Szklarczyk et al. 2017).

Cellular Component (GO)			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0032991	macromolecular complex	40	1.78e-11
GO:0044446	intracellular organelle part	46	1.14e-09
GO:0044445	cytosolic part	10	2.18e-08
GO:0022626	cytosolic ribosome	8	3.81e-08
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	31	3.81e-08
GO:0044391	ribosomal subunit	9	5.18e-08
GO:0005840	ribosome	10	5.27e-08
GO:0030529	ribonucleoprotein complex	14	3.75e-07
GO:0005829	cytosol	20	3.11e-06
GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit	5	4.09e-06
GO:0043229	intracellular organelle	49	1.37e-05
GO:0043226	organelle	51	2.35e-05
GO:0031988	membrane-bounded vesicle	25	5.83e-05
GO:0015935	small ribosomal subunit	5	7.77e-05
GO:0043234	protein complex	26	0.000137
GO:0044428	nuclear part	24	0.000247
GO:0070062	extracellular exosome	21	0.000247
GO:0005737	cytoplasm	44	0.00026
GO:0044444	cytoplasmic part	34	0.00061
GO:0043227	membrane-bounded organelle	46	0.000695
GO:0005822	intracellular	49	0.000699
GO:0005856	cytoskeleton	16	0.000699
GO:0005634	nucleus	32	0.00108
GO:0044424	intracellular part	48	0.00123
GO:0031981	nuclear lumen	21	0.00127
GO:0044421	extracellular region part	23	0.00137
GO:0070013	intracellular organelle lumen	22	0.00235
GO:0015934	large ribosomal subunit	4	0.00409
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	41	0.00422
GO:0034715	pICln-Sm protein complex	2	0.00533
GO:0044430	cytoskeletal part	12	0.00553
GO:0097458	neuron part	11	0.00684
GO:0005683	U7 snRNP	2	0.00919
GO:0005578	extracellular region	23	0.0105
GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	3	0.0126
GO:0005687	U4 snRNP	2	0.0163
GO:0034709	methylosome	2	0.0163
GO:0016514	SWI/SNF complex	2	0.0187
GO:0071584	npBAF complex	2	0.0187
GO:0071585	nBAF complex	2	0.0217
GO:1902494	catalytic complex	9	0.0221
GO:0044433	cytoplasmic vesicle part	6	0.0244
GO:0000785	chromatin	8	0.0246
GO:0030054	cell junction	10	0.0253
GO:0005685	U1 snRNP	2	0.0263
GO:0044464	cell part	48	0.0283
GO:0034719	SMN-Sm protein complex	2	0.0289
GO:0005623	cell	48	0.0292
GO:0005694	chromosome	8	0.0292
GO:0048471	perinuclear region of cytoplasm	7	0.0305
GO:0044297	cell body	6	0.0322
GO:0005654	nucleoplasm	15	0.0377
GO:0010008	endosome membrane	5	0.0446

3.2.2.4 Subzelluläre Lokalisation von VAMP5 in Müllerzellen der Maus

Da die Expressionsdaten auf eine spezifische Anreicherung von VAMP5 in Müllerzellen hindeuteten (Kapitel 3.2.2.1) und sich in der Immunpräzipitation eine Assoziation von VAMP5

mit vesikulären Proteinen gezeigt hatte (Kapitel 3.2.2.3), sollte die subzelluläre Lokalisation von VAMP5 in Müllerzellen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie näher untersucht werden, wobei die Färbung und Mikroskopie durch den Kollaborationspartner Dr. Frank Pfrieger (INSERM, Straßburg) erfolgte. Tatsächlich konnte VAMP5 gleichmäßig in vesikulären Strukturen von Müllerzellen dargestellt werden (Abb. 18A). Ebenso war VAMP5 sowohl in Müllerzell-Endfüßen, die den Abschluss der Retina hin zum Vitreus bilden, als auch außerhalb der Müllerzelle in direkter räumlicher Nähe zu ihren Endfüßen in möglicherweise von ihr sezernierten vesikelförmigen Strukturen zu lokalisieren (Abb. 18B). Damit schien VAMP5 sowohl in Müllerzell-Endfüßen als auch in von ihren Endfüßen sezernierten vesikulären Strukturen vorhanden zu sein.

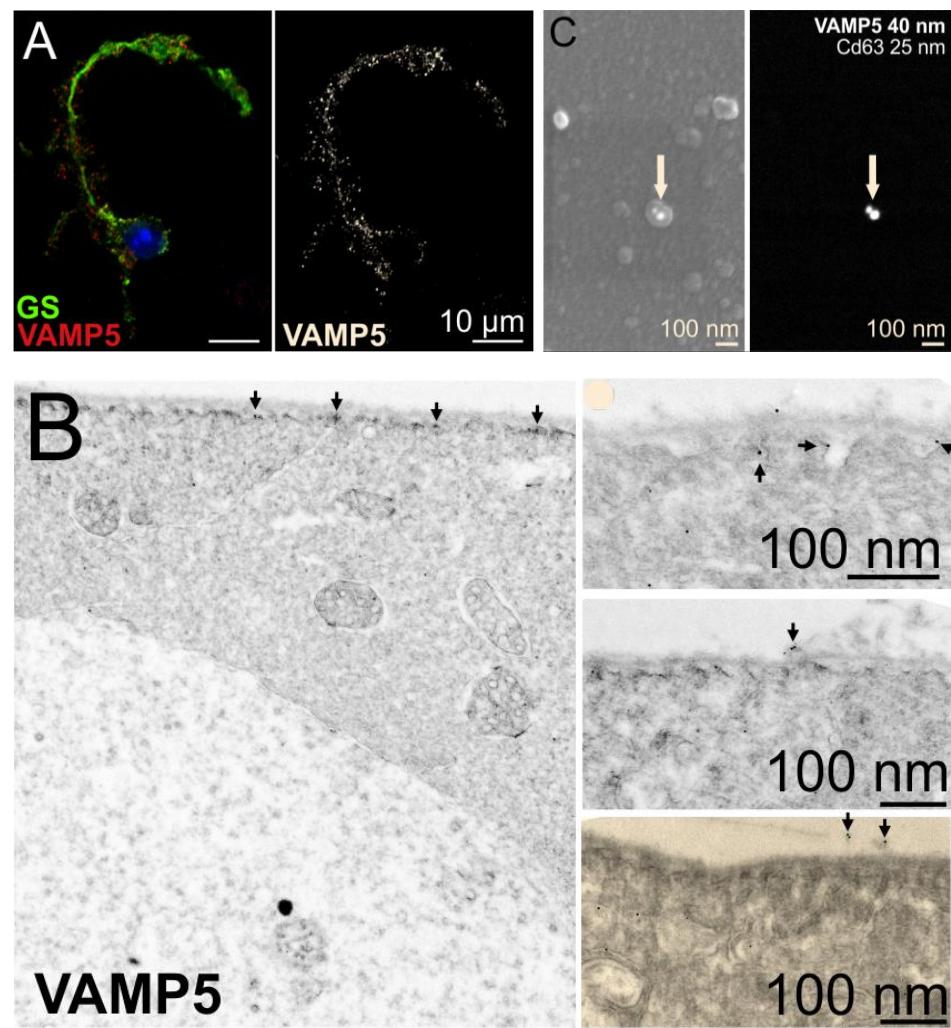


Abbildung 18: Mikroskopische Charakterisierung von VAMP5 in der Müllerzelle. Darstellung von VAMP5 mittels (A) Lichtmikroskopie (Glutaminsynthetase diente als Marker für Müllerzellen, DAPI färbte die Zellkerne, VAMP5-Färbung zur Detektion von VAMP5) und (B) Elektronenmikroskopie in Müllerzellen sowie in möglicherweise von Müllerzellen sezernierten vesikulären Strukturen (VAMP5-Färbung zur Detektion von VAMP5). (C) Elektronenmikroskopische Analyse von aus Müllerzellen isolierten Exosomen mittels Färbung von CD63 als Exosomenmarker sowie von VAMP5 (Isolation nach Protokoll in Kapitel 2.2.11). Die Färbung und Mikroskopie erfolgte jeweils durch den Kollaborationspartner Dr. Frank Pfrieger (INSERM, Straßburg).

3.2.3 Exosomen als möglicher Sekretionsmechanismus

Folglich stellte sich die Frage, um welches Zellorganell es sich bei den vesikelförmigen Strukturen handelte. Hierfür kamen Exosomen, also sekretorische Vesikel (Kapitel 1.3.3), in Frage, auch zumal sich bereits in der Immunpräzipitation eine Assoziation von VAMP5 mit exosomalen Proteinen gezeigt hatte. Um zunächst Exosomen aus der Müllerzelle zu isolieren, wurden zwei unterschiedliche Kits für die Isolation von Exosomen getestet und verglichen (Kapitel 2.2.11). Aufgrund der überzeugenderen Ergebnisse und der unkomplizierteren Handhabung wurde das Kit der Firma Invitrogen bevorzugt und zum Erheben der hier aufgeführten Daten verwendet. Anschließend konnten die aus Müllerzellkulturen angereicherten Exosomen mittels Elektronenmikroskopie und Western Blot genauer charakterisiert werden.

Die elektronenmikroskopische Analyse von aus Müllerzellen isolierten Exosomen demonstrierte eine wiederholte Kolokalisation des Exosomenmarkers CD63 (Peterson et al. 2015) und mit VAMP5 (Färbung und Mikroskopie durch den Kollaborationspartner Dr. Frank Pfrieger, INSERM, Straßburg; Kapitel 3.2.2.4, Abb. 18C). Damit konnte zum einen belegt werden, dass Exosomen erfolgreich aus Müllerzellkulturen angereichert werden konnten. Das bedeutete folglich, dass Müllerzellen Exosomen sezernierten, die mithilfe des verwendeten Isolationsprotokolls verlässlich isoliert werden konnten. Zum anderen konnte aufgrund der Kolokalisation von Exosomenmarker und VAMP5 auf deren Koexpression in Müllerzellen geschlossen werden.

In einem weiteren Schritt sollten die aus Müllerzellen isolierten Exosomen via Western Blots für die Exosomenmarker CD9 und CD63 (Peterson et al. 2015) näher charakterisiert werden. Erneut waren einige Vorversuche nötig, um ein reproduzierbares Western Blot-Protokoll zu etablieren. Dieses ist für CD63 in 2.2.10 aufgeführt, für CD9 ließen sich keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen (Daten nicht gezeigt). CD63 (53 kDa) konnte jedoch in aus Müllerzellkulturen angereicherten Exosomen mittels des von mir entwickelten Western Blot-Protokolls nachgewiesen werden (Abb. 19). Somit war dies ein weiterer Hinweis darauf, dass Müllerzellen Exosomen sezernierten. Der Western Blot-Nachweis von VAMP5 in der entsprechenden Exosomenfraktion scheiterte vermutlich an einem zu geringen Expressionsniveau bzw. einer zu niedrigen Proteininputmenge, die aus der Exosomenfraktion gewonnen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

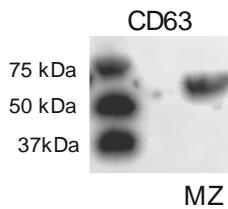


Abbildung 19: Western Blot von aus Müllerzellen isolierten Exosomen für den Exosomenmarker CD63. Aufgetragen sind der Proteinstandard und 33 µg Protein von aus Müllerzellen isolierten Exosomen (MZ); Entwicklungsdauer 1 min, Exosomenisolation nach 2.2.11.1 und 2.2.11.3. Die Western Blot-Konditionen sind in Kapitel 2.2.10 dargestellt.

3.3 Einfluss der Müllerzell-spezifischen funktionellen Inaktivierung von VAMP1-3 sowie des Knockouts von VAMP7 auf Morphometrie, VAMP- und VGLUT-Expression in der Retina

Die in den beiden eben aufgeführten Kapiteln gewonnenen Ergebnisse wurden in Müllerzellen der gesunden Wildtyp-Maus erhoben. Für weiterführende Experimente sollten hierauf aufbauend unterschiedliche transgene Mausmodelle untersucht werden, um weitere Aufschlüsse über Sekretionsmechanismen in Müllerzellen und speziell die Rolle von VAMPs hierbei zu erhalten. Dabei wurden sowohl VAMP7-Knockout-Mäuse untersucht als auch Mäuse mit einem Müllerzell-spezifischen funktionellen Knockout von VAMP1-3 (Kapitel 2.1.1). Durch deren Kreuzung konnten außerdem erstmals triple-transgene Tiere generiert und analysiert werden, also Mäuse, in denen vor einem VAMP7-defizienten Hintergrund Müllerzell-spezifisch VAMP1-3 ausgeknockt wurde. Diese Züchtung erwies sich als äußerst schwierig, da die Mäuse insgesamt eine reduzierte Fertilität zeigten, sodass insgesamt nur eine geringe Zahl an triple-transgenen (d.h. VAMP7-KO x iBot) Tieren zur Verfügung stand.

3.3.1 Validierung des transgenen Mausmodells mittels qPCR

3.3.1.1 Validierung der Müllerzell-spezifischen Expression von Botulinumtoxin (BoNT)

Slezak et al. (2012) erbrachten einen funktionellen Nachweis dafür, dass BoNT in iBot-Mäusen ausschließlich in Müllerzellen wirksam ist. Ein Nachweis der Zelltyp-spezifischen Expression auf RNA-Ebene fehlte allerdings noch. Um diesen zu erbringen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das BoNT-Transkript mittels TaqMan®-PCR in Müllerzellen von Wildtyp- und iBot-Mäusen (GlastCreER^{T2} x iBot-Transgen) detektiert. Die Expression von BoNT war in Müllerzellen der iBot-Tiere etwa hundertfach höher als in der aus derselben Retina isolierten Neuronenfraktion (Abb. 20). Eine sehr geringe Expression in der Neuronenfraktion könnte durch eine leichte Verunreinigung derselben durch Müllerzellen zustande gekommen sein, da, wie anfangs beschrieben, versuchsbedingt trotzdem noch etwa 0,5 % Müllerzellen in der

Neuronenfraktion zu finden waren (Kapitel 3.1.1). Im Wildtyp war – wie erwartet – kein Transkript für Botulinumtoxin nachweisbar (Abb. 20).

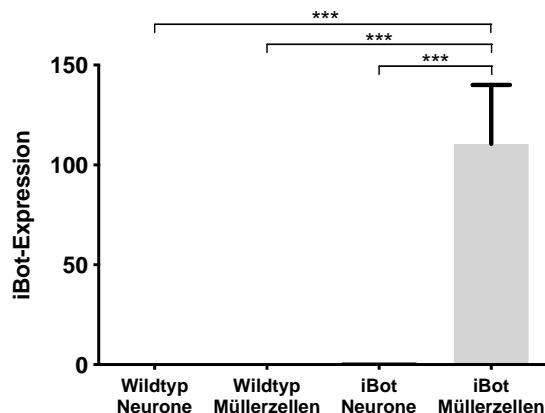


Abbildung 20: Vergleich der Expression von Botulinumtoxin zwischen Neuronen und Müllerzellen im Wildtyp und in bigenen iBot-Mäusen (*GlastCreER^{T2}* x iBot-Transgen) anhand einer quantitativen PCR. Hier wurde das Isolationsprotokoll für die Isolation von Neuronen und Müllerzellen verwendet. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von $n = 2$ unabhängigen Versuchen wieder. Einfaktorielle Varianzanalyse nach Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.1.2 Analyse der Expression von VAMP7 in der VAMP7-Knockout-Maus

In den durchgeführten TaqMan®-PCRs wurde für das VAMP7-Gen die Exon-Intron-Exongrenze zwischen Exon 1 und Exon 2 amplifiziert. Im VAMP7-KO-Tier sind Exon 1 und 2 intakt, während Exon 3 vollständig deletiert wurde. Aus diesem Grund wurden in meinem TaqMan®-Ansatz in der VAMP7-KO-Maus VAMP7-Transkripte exprimiert (Kapitel 3.3.4, Abb. 26). Eine Aussage über einen funktionellen Knockout von VAMP7 kann somit ausschließlich auf Proteinebene getroffen werden. Aufgrund dessen sollte der Nachweis des VAMP7-Knockouts mittels Western Blot erfolgen. In Gesamtretina des Wildtyps konnte VAMP7 im Western Blot nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.2.2). Trotz umfangreicher Western Blot-Versuche gelang es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht, reproduzierbar und quantitativ vergleichbar den Knockout von VAMP7 im genannten Mausmodell nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Analyse der Zellfraktionen der Retina anhand Zelltyp-spezifischer Marker im transgenen Mausmodell

Vorweg sollte ein orientierender Überblick über die Auswirkungen der VAMP-Knockouts auf die Zellfraktionen gewonnen werden. Betrachtete man die Expression der Zelltyp-spezifischen Marker in den retinalen Zellfraktionen von Wildtyp-, VAMP7-KO- sowie triple-transgenen Mäusen, fiel auf, dass die Zellverteilungen in der Netzhaut gleich zu bleiben schienen, unabhängig vom Genotyp der Maus (Abb. 21). Es konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Zellgruppen zwischen den unterschiedlichen Genotypen festgestellt werden.

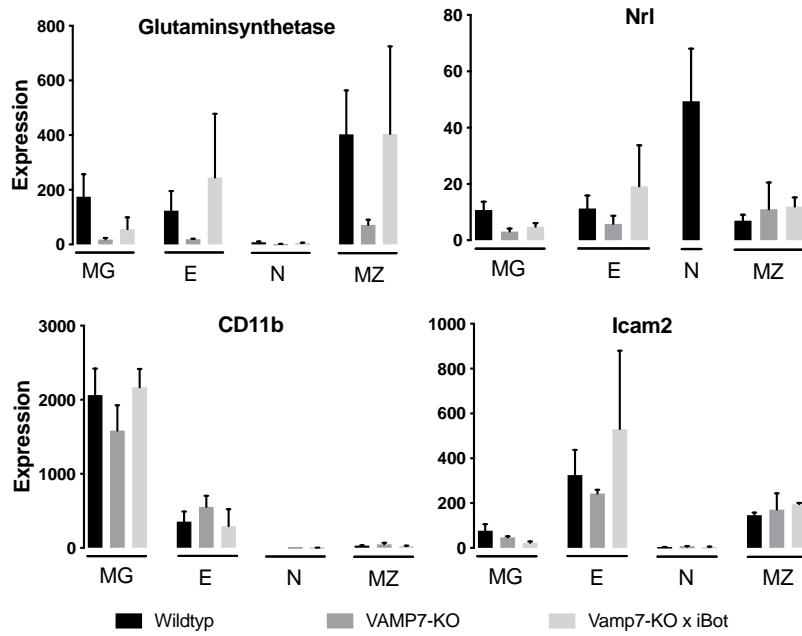


Abbildung 21: Expression Zelltypspezifischer Marker in mittels MACS®-System aus der Retina isolierten Zellfraktionen in den unterschiedlichen Genotypen (quantitative PCR). Hier wurde das Isolationsprotokoll für die Isolation von Neuronen, Müllerzellen, Mikroglia und Endothelzellen verwendet. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von $n = 6$ (Ausnahmen: $n = 2$ für Vamp7-KO, $n = 3$ für VAMP7-KO x iBot) unabhängigen Versuchen wieder. Analyse mittels ungepaartem T-Test. * $p < 0,05$. Signifikanzen zwischen den einzelnen Zellpopulationen sind nicht dargestellt. MG: Mikroglia; E: Endothelzellen; N: Neurone; MZ: Müllerzellen.

3.3.3 Morphometrische Analyse der retinalen Integrität im transgenen Mausmodell

In einem weiteren Schritt wurden die unterschiedlichen Genotypen auf histologischer Ebene verglichen. Hierfür erfolgte die morphometrische Analyse sowohl von zentralen und peripheren Retinaschnitten als auch von retinalen Flachpräparaten.

3.3.3.1 Analyse von Retinaschnitten unterschiedlicher Genotypen

In der Analyse der zentralen Retinaschnitte zeigten sich zunächst keine größeren morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen (Abb. 22). Weiterführend wurden mithilfe des Programms *ImageJ* die Zellzahlen der einzelnen Retinaschichten sowie die Schichtdicken der IPS verglichen (Abb. 23). Für die Schichtdicke der IPS ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Abb. 23B). Auch hinsichtlich der Zellzahlen zeigten sich weder in der GZS noch in der IKS oder ÄKS signifikante Unterschiede (Abb. 23A). Zudem fand sich in der Auswertung von Calretininfärbungen, in denen in der GZS Ganglienzellen und disanzierte Amakrinzellen und in der IKS Amakrinzellen markiert sind, in der GZS kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen. Überraschenderweise ließ sich jedoch ein signifikanter Unterschied für die Calretinin-positiven Amakrinzellen der IKS feststellen: Sowohl im VAMP7-KO-Tier als auch im triple-transgenen Tier zeigte sich eine geringere Zellzahl dieses Zelltyps im Vergleich zum Wildtyp, während sich die Werte im VAMP7-KO- und im triple-transgenen Tier ähnelten (Abb. 23C).

Die Analyse der peripheren Retinaschnitte nach Färbung mit α -VAMP7 erbrachte leider keine verlässlichen Ergebnisse, sodass keine validen Aussagen zum VAMP7-Nachweis im Retinaschnitt getroffen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

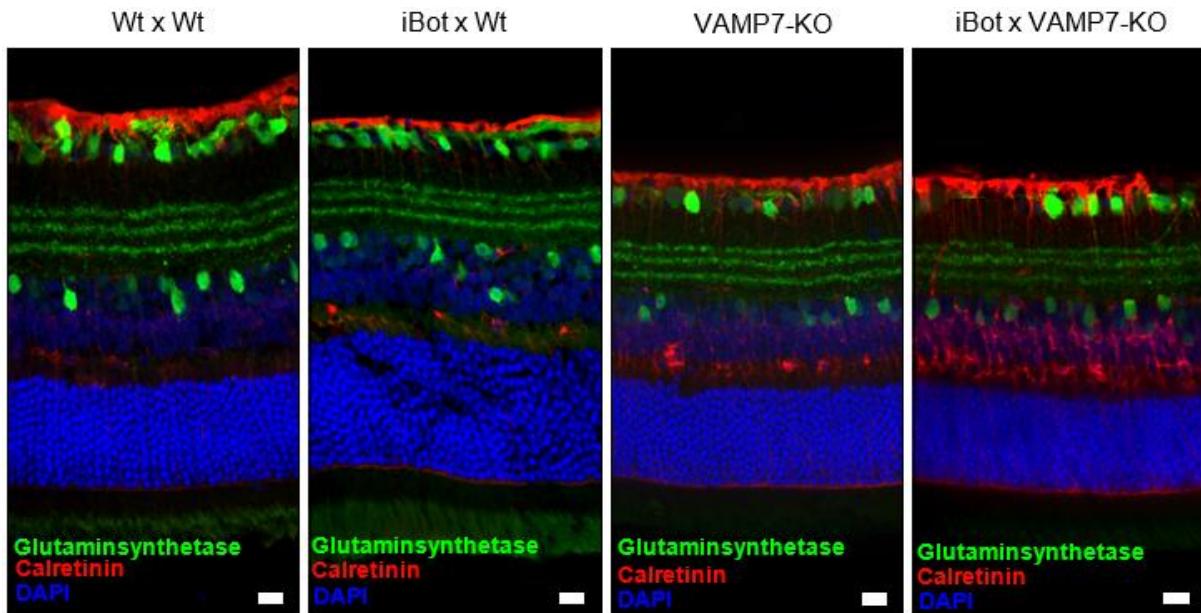


Abbildung 22: Vergleich der Morphometrie der Netzhaut in unterschiedlichen Genotypen anhand von Retinaschnitten. Immunfluoreszenzmikroskopie von jeweils einem zentralen Retinaschnitt aus einem Wildtyp-Tier, Wildtyp x iBot-Tier, VAMP7-KO-Tier und triple-transgenen Tier (VAMP7-KO x iBot), die wie in Kapitel 2.2.3.1 dargestellt hergestellt und gefärbt wurden. Glutaminsynthetase diente als Marker für Müllerzellen, Calretinin färbte in der GZS Ganglionzellen und dislozierte Amakrinzellen und in der IKS Amakrinzellen. Die Kerne aller in der Probe befindlicher Zellen wurden durch eine DAPI-Färbung dargestellt. Größenstandard: 20 μm .

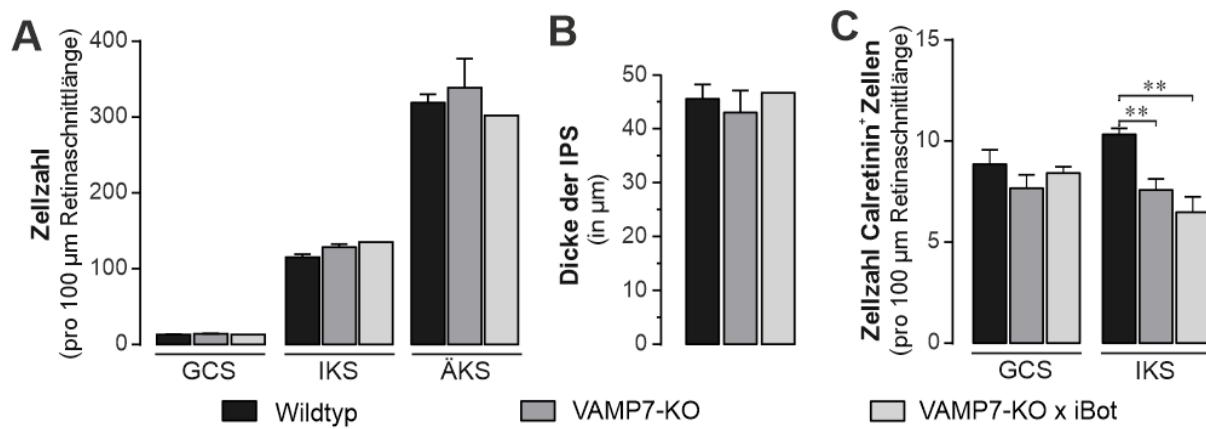


Abbildung 23: Vergleich der Genotypen bezüglich der Zellzahl in den unterschiedlichen Retinaschichten, Dicke der IPS und Anzahl der Calretinin-positiven Zellen abhängig von der Retinaschicht. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse folgender Anzahl unabhängiger Versuche (Anzahl Versuchstiere) wieder: n = 10 für WT, n = 6 für VAMP7-KO, n = 6 für VAMP7-KO x iBot. Für jedes Versuchstier wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung je 3 repräsentative zentrale Retinaschnitte ausgezählt (für die IPS-Messung erfolgten je 3 Messungen pro Schnitt) und der Mittelwert hieraus gebildet. Analyse mittels ungepaartem T-Test. *p < 0,05; **p < 0,01.

3.3.3.2 Analyse von Mikroglia in retinalen Flachpräparaten unterschiedlicher Genotypen

Aufgrund der Ergebnisse der morphometrischen Auswertung, die in der inneren Körnerschicht des Wildtyps signifikant mehr Amakrinzellen als in der des VAMP7-KO-Tiers und des triple-transgenen Tiers ergeben hatte (Kapitel 3.3.3.1), sollte untersucht werden, ob sich weitere indirekte Hinweise auf ein Absterben der Amakrinzellen im transgenen Tier finden ließen. Hierfür wurden Mikrogliazellen histologisch untersucht. Mikroglia reagieren auf das Absterben von Zellen mit einer Aktivierung, die mit einer Veränderung ihrer Morphologie von einer stark ramifizierten Zelle mit langen Fortsätzen und kleinem Soma hin zu einer amöboiden Zelle mit verkürzten oder gar ganz eingezogenen Fortsätzen und vergrößertem Soma einhergeht (Silverman und Wong 2018).

Somit sollte analysiert werden, ob es in den transgenen Mäusen zu einem langsamen Absterben der Amakrinzellen und einer damit einhergehenden Mikrogliaaktivierung kam und ob dabei ein Unterschied zwischen VAMP7-defizienten Mäusen und triple-transgenen Mäusen bestand.

Um die Morphologie von Mikroglia zu untersuchen, eignen sich insbesondere retinale Flachpräparate, da sich hier die Anzahl, Morphologie und räumliche Ausdehnung des Mikrogliafortsatzbaums optimal beurteilen lassen. Erneut zeigten sich keine größeren morphometrischen Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (Abb. 24 A - C). Zur genaueren Analyse wurden mittels des Programms *ImageJ* in den unterschiedlichen Genotypen (Wildtyp-, triple-transgene und VAMP7-KO-Maus) jeweils in der IPS und ÄPS die Zellzahl und Somafläche sowie die Fläche, welche die Mikroglia mit ihren Fortsätzen okkupierten, bestimmt (Abb. 24 D - E). Bezuglich Zellzahl, Somagröße und Verhältnis zwischen IPS und ÄPS ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen feststellen (Abb. 25). Betrachtete man die durch die Fortsätze okkupierte Fläche, fiel zwar ein Unterschied zwischen IPS und ÄPS auf, dieser zeigte sich jedoch nur im Wildtyp und stand nicht in Zusammenhang mit den transgenen Tieren. Es konnte also keine eindeutige Aktivierung von Mikroglia in den verschiedenen transgenen Mauslinien nachgewiesen werden.

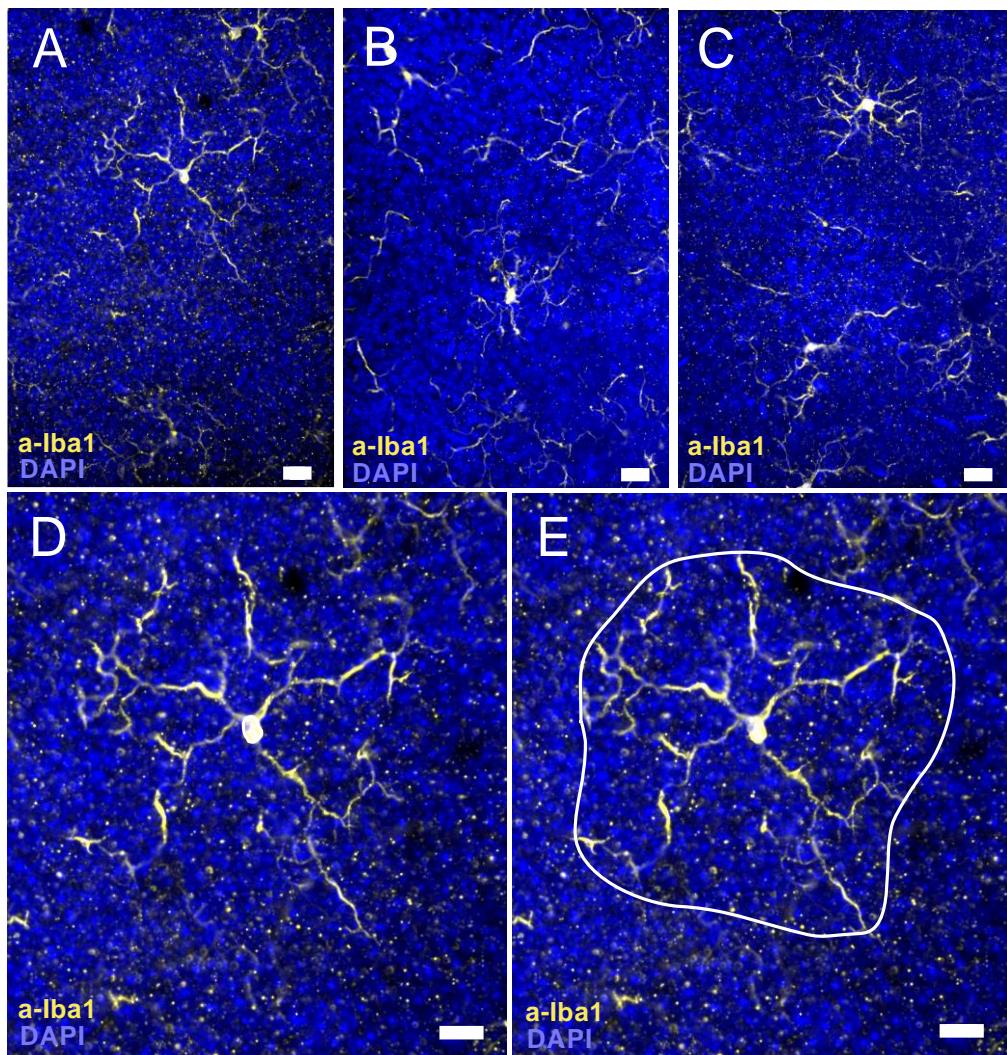


Abbildung 24: Immunfluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Morphometrie von Mikroglia in retinale Flachpräparaten. Iba-1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*) diente als Marker für Mikroglia, die Kerne aller in der Probe befindlicher Zellen wurden durch eine DAPI-Färbung dargestellt. Gezeigt ist die IPS im (A) Wildtyp, (B) VAMP7-KO-Tier, (C) VAMP7-KO x iBot-Tier. Außerdem ist die Vorgehensweise bei der Messung der Fläche des Zellkerns (D) und der insgesamt durch die Zelle okkupierten Fläche (E) in der IPS eines Wildtyps mittels des Programms *ImageJ* dargestellt. Größenstandard: 20 µm.

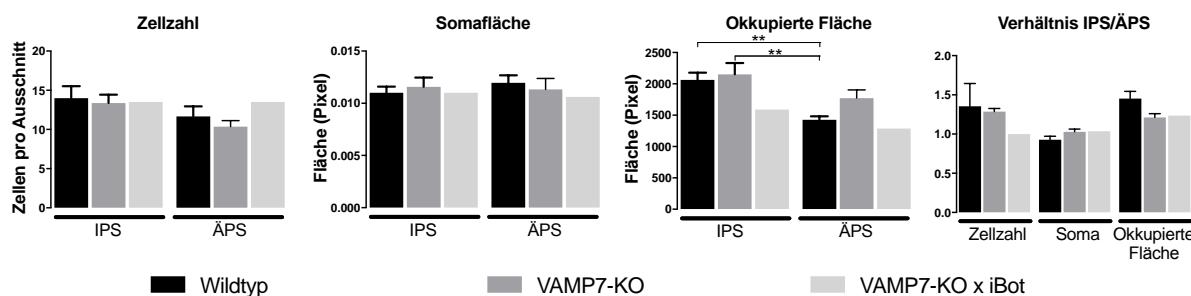


Abbildung 25: Histologischer Vergleich der Mikrogliazellen von Wildtyp-, VAMP7-KO- und VAMP7-KO x iBot-Mäusen bezüglich der Zellzahl, des Somaareals, der durch die Zelle insgesamt okkupierten Fläche und des jeweiligen Verhältnisses zwischen IPS und ÄPS im retinale Flachpräparat. Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler und geben die Ergebnisse von n = 6 (Wildtyp) bzw. n = 4 (VAMP7-KO) bzw. n = 1 (VAMP7-KO x iBot) unabhängigen Versuchen wieder. Die Analysen erfolgten mittels „Stacking“-Aufnahmen der zentralen Retina bei 20-facher Vergrößerung. Für die Zellzahl wurden jeweils alle sich im betreffenden Ausschnitt befindlichen Mikrogliazellen der IPS/ÄPS pro Versuchstier gezählt und der Mittelwert hieraus gebildet. Für die Somafläche und okkupierte Fläche wurden für jedes Versuchstier pro Schicht je 5 repräsentative Zellen ausgemessen und der Mittelwert hieraus gebildet. Analyse mittels ungepaartem T-Test. *p < 0,05; **p < 0,01.

3.3.4 Analyse der VAMP-Expression in der Retina der transgenen Maus

Aufbauend auf den Analysen von VAMPs in den retinalen Zellfraktionen der Wildtyp-Maus (Kapitel 3.2) wurde ihre Expression in der Retina nach Knockout von VAMP1-3 (funktionell, Müllerzell-spezifisch) und VAMP7 (ubiquitär) untersucht, um mögliche Kompensationsprozesse aufzudecken.

Betrachtete man die Expression der einzelnen VAMPs in Müllerzellen jeweils bezogen auf deren Expression in Wildtyp-Müllerzellen, ließen sich mit einer Ausnahme keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren detektieren (Abb. 26). Das schien zu bedeuten, dass beim Ausknocken einzelner VAMPs weder andere VAMPs in Müllerzellen herunter-, noch kompensatorisch heraufreguliert wurden. Lediglich VAMP7 zeigte in den Müllerzellen der Tiere, in denen das Gen ausgeknockt war (VAMP7-KO und triple-transgen), eine signifikant niedrigere Expression als im Wildtyp.

Auch innerhalb der anderen aus der Retina isolierten Zellgruppen (Endothelzellen, Mikroglia, Neuronen) konnten in Bezug auf die VAMP-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Genotypen festgestellt werden (Abb. 27).

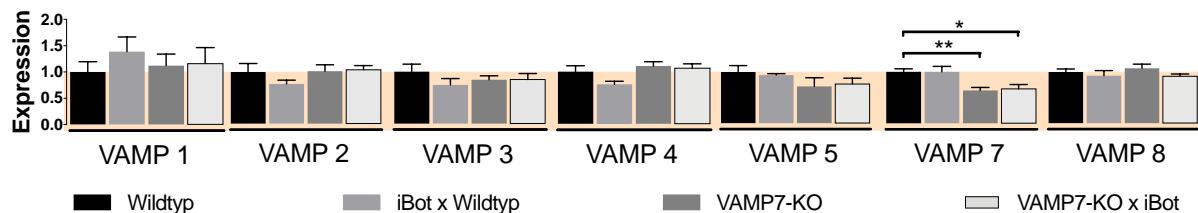


Abbildung 26: Expression von Mitgliedern der VAMP-Familie in Müllerzellen der verschiedenen Mauslinien zum funktionellen Knockout verschiedener VAMPs (quantitative PCR). Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von $n = 6$ (VAMP7-KO) bzw. $n = 4$ (VAMP7-KO x iBot) bzw. $n = 5$ (Wildtyp; Ausnahmen: $n = 4$ für VAMP1 und VAMP7 im Wildtyp, $n = 6$ für VAMP3 im Wildtyp) bzw. $n = 3$ (iBot x Wildtyp; Ausnahme: $n = 2$ für VAMP5 im iBot x Wildtyp) unabhängigen Versuchen wieder. Analyse mittels ungepaartem T-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

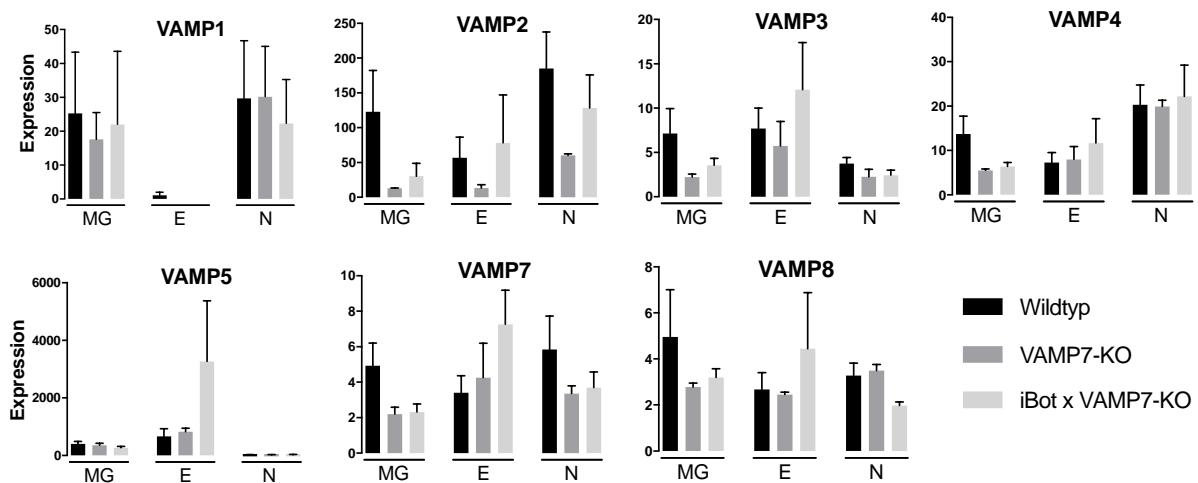


Abbildung 27: Expression der VAMP-Subtypen in den unterschiedlichen retinalen Zellpopulationen und genetischen Hintergründen mittels quantitativer PCR. MG: Mikroglia; E: Endothelzellen; N: Neurone. Hier wurde das Isolationsprotokoll für die Isolation von Neuronen, Müllerzellen, Mikroglia und Endothelzellen verwendet. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von folgender Anzahl unabhängiger Versuche wieder: Für Wildtyp n = 6 (Ausnahmen: n = 4 für VAMP1 in Neuronen, n = 2 für VAMP1 in Mikroglia und Endothelzellen, n = 5 für VAMP3 in Mikroglia). Für VAMP7-KO n = 2. Für VAMP7-KO x iBot n = 3 (Ausnahmen: n = 2 für VAMP1 in allen Fraktionen). Einfaktorielle Varianzanalyse nach Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; Signifikanzen zwischen den einzelnen Zellpopulationen sind nicht aufgetragen.

3.3.5 Retinale Expression von VGLUT3 im transgenen Mausmodell

Da der vesikuläre Glutamat-Transporter VGLUT3 besonders in Müllerzellen und signifikant seltener in retinalen Neuronen nachweisbar war (Kapitel 3.2.1), stellte sich die Frage, ob ein Knockout von VAMP7 Einfluss auf die VGLUT3-Expression hatte. Mittels quantitativer PCR ergaben sich für VGLUT3 insgesamt keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und transgendem Tier (Abb. 28). Die Expression von VAMP7 schien also keinen Einfluss auf die Expression von VGLUT3 zu haben. Diese Daten bestätigten und erweiterten die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1, da auch in diesem unabhängigen Versuch VGLUT3 signifikant häufiger in Müllerzellen als in Neuronen exprimiert war. Im Isolationsprotokoll zu diesem Versuch wurde im Gegensatz zur Analyse aller VGLUTs im Wildtyp (Kapitel 3.2.1) außerdem nun auch Mikroglia aus der Retina isoliert. In ihrer Fraktion war VGLUT3 - analog zur Expression in Neuronen - ebenfalls signifikant geringer exprimiert als in Müllerzellen.

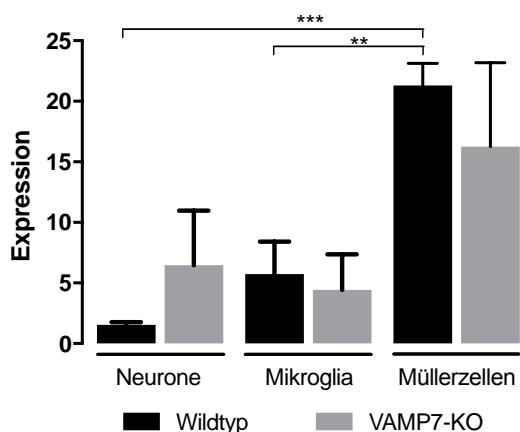


Abbildung 28: Expression von VGLUT3 in der Wildtyp- und VAMP7-Knockout-Maus anhand einer quantitativen PCR. Hier wurde das Protokoll für die Isolation von Neuronen, Müllerzellen und Mikroglia verwendet. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler und geben die Ergebnisse von n = 3 unabhängigen Versuchen wieder. Analyse mittels ungepaartem T-Test. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Sekretionsmaschinerie von Müllerzellen in der Mausretina aufzuklären und damit einen zentralen Kommunikationsweg mit benachbarten Zellen besser zu verstehen. Grundvoraussetzung hierfür waren zunächst die Etablierung und Validierung einzelner Protokolle zur Zelltyp-spezifischen Expressionsanalyse, z.B. via Western Blot oder quantitativer PCR, aber auch die des Protokolls zur Müllerzellaufräumigung als Solches sowie das transgene Mausmodell (Kapitel 4.1). In meiner Dissertation konnten hierauf aufbauend auch Aussagen nicht nur zu den Müllerzellen, sondern auch zu Endothelzellen, Mikrogliazellen und Neuronen der Netzhaut getroffen werden (Kapitel 4.2). Der Schwerpunkt lag jedoch auf der Charakterisierung von Müllerzellen und deren Expression wichtiger Komponenten zur vesikulären Freisetzung von Glutamat (Kapitel 4.3).

4.1 Protokolletablierungen und transgenes Mausmodell

Grundlage aller Müllerzellexperimente war eine verlässliche Isolation möglichst intakter Müllerzellen, wofür das Protokoll zur Müllerzellisolation in dieser Doktorarbeit weiterentwickelt wurde. Für alle Proteinnachweise in vorliegender Arbeit waren Western Blots nötig, für die bisher in der Retina zu den hier untersuchten Proteinen teilweise kein Protokoll zur Verfügung stand.

4.1.1 Etablierung und Validierung des Müllerzellisolationsprotokolls

Im Verlauf meiner Dissertation sollte ein schon bestehendes Protokoll meiner Arbeitsgruppe zur Müllerzellisolation mittels MACS®-Technik optimiert werden. Sowohl histologisch (Kapitel 3.1.1) als auch in qPCR-Tests (Kapitel 3.1.2) konnte gezeigt werden, dass es mein weiterentwickeltes Protokoll nun leistet, sehr spezifisch Müllerzellen von Mikroglia, Endothelzellen und Neuronen zu trennen.

Dies kommt einerseits der weiteren Erforschung der Müllerzellen zugute, da ihre Isolation aus der Netzhaut die Basis der meisten weiteren Müllerzellexperimente ist und zur Charakterisierung einer Zelle, insbesondere einer Gliazelle, die Erforschung ihrer Interaktionen mit den Nachbarzellen eminent ist. Gerade in Zusammenhang mit Mikroglia wird vermutet, dass die Mikroglia-Müllerzell-Interaktion eine Rolle bei der Initiation der Müllerzellgliose spielt (Kapitel 1.2; Harada et al. 2002; Roche et al. 2018), welche ein Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen der Netzhaut ist (Roche et al. 2018). Andererseits eröffnet es neue Möglichkeiten, die anderen drei isolierten Zelltypen in der Retina zu untersuchen.

Unseres Wissens nach existierte bisher kein Protokoll zur parallelen Isolation von Mikroglia und Endothelzellen sowie retinaler Neuronen mittels MACS®-Technik. Obwohl in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf den Müllerzellen lag, wurden dadurch auch neue Aussagen zu den anderen retinalen Zelltypen möglich (Kapitel 4.2).

Trotz des erzielten Erfolgs müssen jedoch auch die derzeitigen Limitationen dieser Methode gesehen werden.

Zum einen ist neben dem Nachweis isolierter Müllerzellen auf histologischer und Expressionsebene zur Vervollständigung eine ergänzende Darstellung auf Proteinebene wünschenswert. Western Blots aus isolierten Müllerzellen für den Müllerzellmarker CD29 waren allerdings aus verschiedenen Gründen (Kapitel 4.1.2) bisher ohne Erfolg, sodass weitere Experimente zur Etablierung eines funktionsfähigen Protokolls sinnvoll wären.

Zum anderen sollte an Methoden gearbeitet werden, die eine noch höhere Reinheit der Zellfraktionen ermöglichen könnten, um eine noch spezifischere Bewertbarkeit der erhobenen Daten zu gewährleisten. Aus den TaqMan®-Daten konnte geschlossen werden, dass die Mikrogliafraktion möglicherweise durch Neuronen und die Müllerzellfraktion durch Endothelzellen verunreinigt war (Kapitel 3.1.2, Abb. 12). Ebenso konnte im ausgewerteten Versuch für CD11b zwischen Mikroglia und Müllerzellen kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Hierbei ist allerdings auch darauf hinzuweisen, dass für diese TaqMan®-PCR nur eine kleine Anzahl biologischer Replikate verwendet wurde (Kapitel 3.1.2, Abb. 12) und eine Erhöhung der n-Zahl erstrebenswert wäre, um etwaige weitere signifikante Unterschiede darzustellen und die Reliabilität der Daten zu verbessern.

Die Reinheit der Zellpopulationen stieg mit der Anzahl der Versuchswiederholungen, was zeigte, dass mit zunehmendem Training bessere Ergebnisse hinsichtlich der Reinheit und Unversehrtheit der Zellen erzielt werden konnten (Kapitel 3.1.1). Für Müllerzellen konnte ich gegen Ende der Versuche im Rahmen meiner Doktorarbeit eine Reinheit von fast 95 % erreichen (Kapitel 3.1.1). Dabei lag der Anteil der Müllerzellen in ihrer Fraktion vermutlich höher als der histologisch ermittelte, da Müllerzellen auf mechanischen Stress sehr empfindlich mit dem Verlust ihrer langen Fortsätze reagieren und Zellen ohne Fortsätze nicht als Müllerzellen gezählt wurden. Um die Reinheit der Endothelfraktion und Mikrogliafraktion einschätzen zu können, wäre außerdem ergänzend auch in diesen Fraktionen eine histologische Reinheitskontrolle sinnvoll.

Bei der MACS®-Isolation von anderen Zellen konnte laut Literatur maximal eine Reinheit von bis zu 99 % erreicht werden (Tomlinson et al. 2013), was für künftige Isolationen auch bei dem in vorliegender Arbeit verwendeten Verfahren stets das Ziel sein sollte. Ob jedoch eine noch größere Reinheit der Zellfraktionen als die oben angegebenen 95 % zu erzielen ist, ist fraglich, da sich eine leichte Verunreinigung letztlich nie vermeiden lassen wird. Dies sollte in weiterführende Analysen immer mit einberechnet werden. Prinzipiell wäre es auch möglich, jeden MACS®-Durchlauf zweimalig pro Zellfraktion durchzuführen. So könnten die im ersten Durchlauf nicht selektierten Zellen im zweiten Durchlauf eluiert werden. Allerdings würde dies den mechanischen Stress auf die Zellen nochmals deutlich erhöhen. Grund hierfür ist zum einen der erneute Durchlauf durch die Säule, zum anderen die längere Experimentendauer. Da aber die Ergebnisse aufgrund der besonderen Anfälligkeit von Müllerzellen gegenüber mechanischem Stress wiederum weniger aussagekräftig wären, stellt dieser Ansatz insgesamt keine vielversprechende Alternative dar.

Auf dem Isolationsprotokoll aufbauend konnte außerdem weiterführend durch unsere Arbeitsgruppe eine Müllerzellkultivierung etabliert werden, sodass in dieser Dissertation unseres Wissens nach erstmals Analysen an intakten, nativen, aufgereinigten Müllerzellen möglich waren, die nur sehr kurzfristig kultiviert wurden (Kapitel 3.2.3; Limb et al. 2002; Hauck et al. 2003; Lawrence et al. 2007; Toerne et al. 2014; Grosche et al. 2016). Dies ebnete den Weg für eine neue Phase der Müllerzellexperimente, indem auf ressourcensparende Weise molekulare und zelluläre Aspekte erforscht werden können.

4.1.2 Proteinnachweise mittels Western Blot

Einen großen Teil dieser Doktorarbeit bildeten Western Blot-Versuche. Generell gestaltete sich der Proteinnachweis in der Retina und insbesondere in isolierten Müllerzellen via Western Blot äußerst schwierig. Ein Grund hierfür ist, dass nur geringe Proteinmengen aus den einzelnen isolierten Zellpopulationen gewonnen werden konnten. Aus der Müllerzellfraktion von vier Retinae ergaben sich beispielsweise lediglich ca. 15 µg Protein. Dennoch ist es für bestimmte Proteine bereits gelungen (Pauly et al. 2019). Ausschlaggebend ist sicher außerdem das Expressionsniveau des entsprechenden Proteins in der Zelle, wobei das der VAMPs beispielsweise recht niedrig zu sein scheint, was deren Detektion mittels Western Blot zusätzlich erschwerte. Des Weiteren sind die VAMPs als Zielproteine verhältnismäßig klein (Kapitel 1.3.1) und dadurch schwieriger nachzuweisen.

Western Blot-Versuche zum Nachweis von VGLUT3 und CD29 auf Proteinebene sowie von NDRG1 und EIF4A1 zur Etablierung eines neuen *housekeeping*-Proteins waren bislang nicht erfolgreich. Ebenso lieferten Western Blots für VAMPs in der angereicherten Fraktion von Membranproteinen (Kapitel 2.2.8.2) keine zufriedenstellenden Ergebnisse. In Anbetracht des korrekten Beta-Aktin-Blots für die Membranproteinfraktion (Kapitel 3.2.2.2, Abb. 16) schien der entscheidende Faktor hierfür ebenfalls in der erschwerten Antikörperfärbung/-detektion der sehr kleinen VAMPs zu liegen. Des Weiteren war die verfügbare einzusetzende Proteinmenge bei der Verwendung von Membranproteinen noch geringer und damit möglicherweise unter dem Detektionslimit der Methode.

In der Literatur fehlte ein Western Blot-basierter Nachweis der Expression von VAMP3, VAMP5 und VAMP7 durch verschiedene Zelltypen in der Retina noch vollständig. Ich konnte im Rahmen dieser Arbeit, wie auch zuvor unsere Arbeitsgruppe, VAMP3 in der Gesamtretina darstellen. Allerdings erfolgte dies unter anderen Konditionen als den von meiner Arbeitsgruppe zuvor etablierten. Für VAMP5 gelang in der vorliegenden Dissertation erstmals ein zuverlässiger Western Blot-Nachweis in Gesamtretina ohne Darstellung unspezifischer Banden. Mittels des etablierten Protokolls ließ sich darüber hinaus VAMP5 erstmals in der Müllerzellfraktion nachweisen. Zudem gelang es, erstmals ein Protokoll für den erfolgreichen Western Blot-Nachweis von VAMP7 in der Retina zu etablieren. Analog zu den Expressionsanalysen (Kapitel 3.2.2.1) konnte ich somit auch auf Proteinebene zeigen, dass VAMP3, VAMP5 und VAMP7 in der Retina vorlagen und zumindest VAMP5 auch spezifisch in Müllerzellen darstellen (Kapitel 3.2.2.2, Abb. 16).

Weiterführende Ziele der Western Blot-Versuche mit VAMPs sollten sein, nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Ergebnisse in den unterschiedlichen Zellfraktionen und im nächsten Schritt in den unterschiedlichen Genotypen zu erzielen, um die Daten der Expressionsanalysen zu untermauern und auszuweiten. Ein erfolgversprechender Ansatz hierfür wäre, die einzusetzende Proteinmenge zu erhöhen. Dafür könnte man erproben, Protein aus den Zellkulturen der Zellfraktionen herzustellen und einzusetzen (Kapitel 2.2.11.1). Alternativ könnten die Proben mittels massenspektrometrischer Analysen untersucht werden. Allerdings zeigten Daten meiner Arbeitsgruppe, dass auch mit diesem Ansatz VAMPs auf Grund der generell niedrigen Expression kaum detektierbar waren (Grosche et al. 2016).

Darüber hinaus konnte für den Exosomenmarker CD63 ein Western Blot-Protokoll zum Exosomennachweis in Müllerzellen etabliert werden (Kapitel 3.2.3, Abb. 19). Dieses bietet neue Möglichkeiten, Müllerzell-Exosomen auf Proteinebene qualitativ und quantitativ weiter

zu untersuchen, z. B. im transgenen Tier. Leider gelang es aus Zeitgründen bisher nicht, die Hypothese einer Koexpression von VAMP5 und Exosomen mittels Western Blot zu bestätigen, was es in weiteren Arbeiten zu untersuchen gilt.

4.1.3 Validierung des transgenen Mausmodells

Ich konnte, ergänzend zum funktionellen Nachweis von Slezak et al. (2012), auf Transkript-Ebene zeigen, dass BoNT in iBot-Mäusen (GlastCreER^{T2} x iBot-Transgen) ausschließlich in Müllerzellen wirksam ist (Kapitel 3.3.1.1, Abb. 20). Der Nachweis, dass hierdurch nach Tamoxifeninjektion letztlich funktionell VAMP1-3 Müllerzell-spezifisch ausgeknockt werden, ist mittels qPCR nicht möglich. VAMP1-3 werden durch die proteolytische Aktivität von Botulinumtoxin gespalten und dadurch funktionsunfähig, das heißt, dass ihre mRNA durchaus per qPCR (Kapitel 3.3.4) nachweisbar ist.

Danglot et al. (2012) konnten auf mRNA-Ebene zeigen, dass deren etablierte VAMP7-KO-Maus zum funktionellen Knockout von VAMP7 führte. In den in dieser Arbeit vorliegenden Expressionsanalysen ließ sich im VAMP7-Knockout-Tier im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant niedrigere, aber noch vorhandene VAMP7-Expression nachweisen (Kapitel 3.3.4, Abb. 26). Diese Ergebnisse sind konsistent dazu, dass mit meinem TaqMan®-Ansatz in der VAMP7-KO-Maus möglicherweise verkürzte VAMP7-Transkripte detektiert wurden, da die Amplifikation der Exon-Intron-Exongrenze zwischen Exon 1 und Exon 2 erfolgte, jedoch im VAMP7-KO-Tier ausschließlich Exon 3 deletiert ist. Dies stimmt mit den Daten der Erstbeschreibung des Mausmodells (Danglot et al. 2012) überein. Eine qPCR auf die Exongrenze Exon2/Exon3 oder Exon3/4 sollte keine Expression im VAMP7-Tier zeigen. Zur entsprechenden cDNA-Sequenz sind jedoch keine passenden Primer-Sonden-Kombinationen etablierbar, sodass der Nachweis über diesen methodischen Ansatz nicht möglich war.

Weiterführende VAMP7-Western Blots, um ergänzend zum mRNA-Nachweis von Danglot et al. (2012) auch auf Proteinebene die Ausschaltung von VAMP7 zu verdeutlichen, sind unerlässlich. Diese konnten bisher jedoch noch nicht quantitativ verlässlich, sondern nur qualitativ im Wildtyp reproduziert werden (Kapitel 3.3.1.2). Entsprechend wurde die Interpretation der weiterführenden Analysen der VAMP7-KO-Tiere nur unter dem Vorbehalt des finalen Nachweises eines tatsächlichen VAMP7-Knockouts vorgenommen.

4.2 Interpretation der Ergebnisse zu Endothelzellen, Mikroglia und Neuronen der Retina

Die im Rahmen meiner Doktorarbeit erhobenen Daten lieferten über Müllerzellen hinaus ebenfalls Erkenntnisse über Mikroglia, Endothelzellen und Neuronen der Netzhaut. Dabei

müssen die mittels MACS[®]-Isolation gewonnenen Expressionsergebnisse jedoch vor dem Hintergrund einer möglichen geringen Verunreinigung einzelner Zellfraktionen interpretiert werden (Kapitel 3.1.2).

4.2.1 Mikroglia

Wie in Kapitel 3.1.2 dargelegt, ließen sich mit dem Müllerzellprotokoll Mikroglia und Makrophagen aus der Netzhaut isolieren (Kapitel 3.1.2, Abb. 12). Da sie in der Retina eine wichtige Rolle spielen (Kapitel 1.2), beispielsweise durch Regulation der neuronalen Aktivität (Silverman und Wong 2018), ist eine Analyse molekularer Sekretionsgrundlagen auch in ihnen interessant.

Auf histologischer Ebene umfassten die Mikroglia-Experimente Zellzahl, Somaareal, okkupierte Fläche und Verhältnis von IPS zu ÄPS (Kapitel 3.3.3.1, Abb. 24+25). Auf Expressionsebene wurde die Expression von Zelltyp-spezifischen Markern, VAMP1-8 und VGLUT3 getestet (Kapitel 3.3.2, Kapitel 3.3.4 und Kapitel 3.3.5). Bezuglich der in transgenen Tieren erhobenen Daten muss allerdings angemerkt werden, dass aufgrund des oben angesprochenen Zuchtengpasses die Quantifizierung für die triple-transgene Mauslinie nur aus einem Tier und für den VAMP7-KO-Genotyp nur aus vier Tieren gewonnen werden konnte, was die Aussagekraft der Daten einschränkt. Des Weiteren ist bei der Interpretation aller Mikrogliaexpressionsdaten ihre Rolle als phagozytierende Zellen zu bedenken. Die Expression von in Mikrogliazellen gering vorhandenen Genen ist von der Expression derselben Gene in den durch Mikrogliazellen phagozytierten Zellen mittels TaqMan[®]-PCR nicht zu unterscheiden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VAMP1-8 allesamt in Mikroglia der Retina exprimiert wurden (Kapitel 3.2.2.1, Abb. 15). Die geringe qPCR-Detektion von VGLUT3 in Mikroglia könnte vermutlich durch die Verunreinigung der Zellfraktion mit anderen retinalen Zellen zustande gekommen sein (Kapitel 3.3.5, Abb. 28), auch zumal VGLUT3 in bisherigen Studien nicht in retinaler Mikroglia nachgewiesen werden konnte (Michalski et al. 2013). Eine ausführliche Expressionsanalyse bezüglich der VGLUT-Expression in Mikrogliazellen sollte in folgenden Studien ergänzt werden.

Sowohl auf Expressionsebene als auch auf histologischer Ebene ergaben sich in den erhobenen Experimenten für Mikroglia keine Unterschiede zwischen den Wildtyp-, VAMP7-KO- und VAMP7-KO x iBot-Mäusen. Einzige Ausnahme hierbei war, dass allein im Wildtyp die durch die Zelle samt Fortsätzen okkupierte Fläche in der IPS größer als in der ÄPS war.

Vergleicht man die in dieser Arbeit histologisch gewonnenen Wildtyp-Daten mit anderen Studien, zeigen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu diesen. Bezuglich des Somaareals kamen auch Hoz et al. (2018) zu dem Ergebnis, dass keine Unterschiede zwischen IPS und ÄPS bestanden. Bezuglich der Zellzahl wurde jedoch in der Literatur für die ÄPS eine signifikant höhere Zellzahl als für die IPS beschrieben (Rojas et al. 2014; Hoz et al. 2018), was in den hier aufgeführten Ergebnissen nicht reproduziert werden konnte (Kapitel 3.3.3.2).

Im Gegensatz zu meinen Daten, in denen die durch die Mikrogliazellen insgesamt okkupierte Fläche in der Wildtyp-IPS größer war als in der Wildtyp-ÄPS (Kapitel 3.3.3.2), hatte sich in der Studie von Rojas et al. (2014) diesbezüglich kein Unterschied gezeigt. Der Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnte im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der für die Experimente untersuchten Mäuse liegen. Eine Studie, in der Mikroglia-Zellzahlen in Kaninchen verglichen wurden, konnte zeigen, dass sich die Zellzahlen zwischen den unterschiedlichen Kaninchen-Arten deutlich unterschieden: Eine Art zeigte in der ÄPS viele Mikrogliazellen, während sich in einer anderen Kaninchen-Population nur wenige befanden (Humphrey und Moore 1995).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren unseres Wissens nach bisher keine anderen Studien mit Fokus auf die VAMP- und VGLUT-Expression in Mikroglia der Netzhaut. Allerdings kann durch Reanalyse von Einzelzell-RNA-Sequenzier (scRNA Seq)-Daten eine erste vergleichende Abschätzung erfolgen. Aktuell gibt es nur von Mausretina von 14 Tage jungen Tieren, bei denen die Retina noch nicht voll ausgereift war, entsprechende Resource-Daten (Macosko et al. 2015). Wir werteten diese bezüglich der Expression der VAMP- und VGLUT-Gene aus (Abb. 29). Ein Vergleich mit den Daten meiner Arbeit bestätigt eine Expression von VAMP8 in Mikroglia. Zudem zeigten diese Daten analog zu meinen VGLUT3-Ergebnissen, dass Transkripte für VGLUTs nicht in Mikroglia detektiert werden konnten.

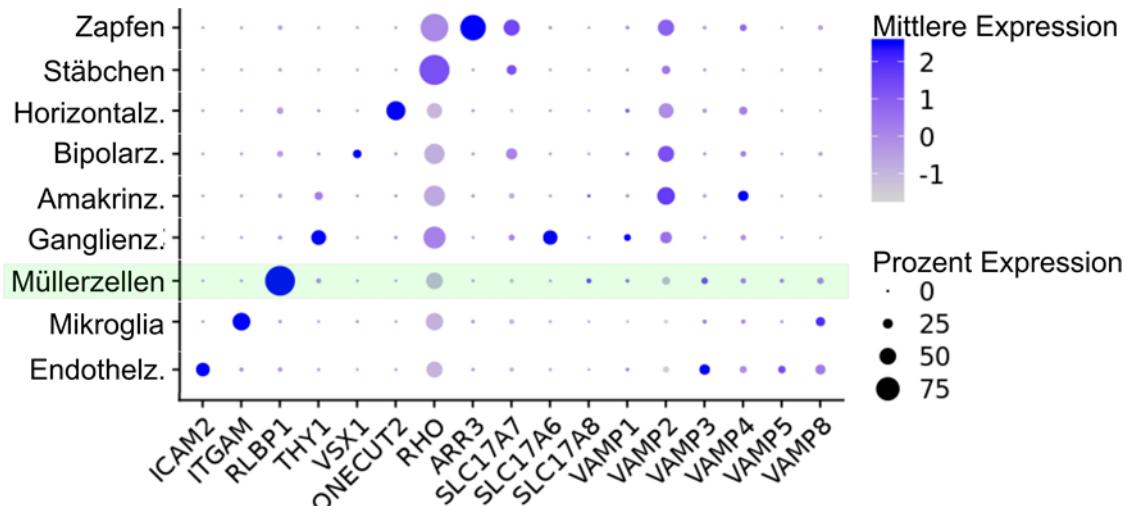


Abbildung 29: VGLUT- und VAMP-Expression in verschiedenen Zelltypen der juvenilen Mausretina (Postnataltag 14) nach Macosko et al. 2015. Die Reanalyse eines Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdatensatzes durch Kollegen meiner Arbeitsgruppe bestätigt teilweise die in meiner Doktorarbeit erhobenen Befunde hinsichtlich der Expression der VAMPs, VGLUT1 (*slc17a7*), VGLUT2 (*slc17a6*) und VLGUT3 (*slc17a8*). Die anderen aufgeführten Gene dienten als Marker für die entsprechenden Zelltypen – *icam2* beispielsweise als Marker für Endothelzellen, *itgam* (CD11b) für Mikroglia oder *rlbp1* als Marker für Müllerzellen. *Vamp7* ist in diesem Datensatz nicht detektiert worden und fehlt entsprechend in der Auflistung.

Zukünftig wäre es sinnvoll, auf dem MACS®-Isolationsprotokoll aufbauend weitere Mikroglia-Experimente in der Retina durchzuführen, z. B. mittels Western Blot-Analysen von VAMPs in Mikroglia und mittels TaqMan®-Expressionsanalysen von Mikroglia für einige weitere Gene. Für das Glaukom zum Beispiel ergaben einige Studien, dass der Degeneration von retinalen Ganglienzellen eine Mikrogliaaktivierung voranging. Aktivierte Mikroglia zeigten eine gesteigerte Expression bestimmter Proteine, z. B. von Toll-like-Rezeptoren (Luo et al. 2010) und von Aktivierungsproteinen wie HLA-DR und CD68 sowie inflammatorischen Mediatoren, Zytokinen (TNF α , NOS-2, COX-1) und Metalloproteasen (Neufeld 1999; Yuan und Neufeld 2001). Welche Proteine außerdem noch in aktivierter Mikroglia überexprimiert sind, könnte z. B. mittels des transgenen Glaukom-Modells DBA/2J (Bosco et al. 2011) an mittels MACS® isolierter Mikroglia untersucht werden. Dies wäre äußerst interessant, zumal solche Experimente die Möglichkeit bieten würden, neue Gene mit großem therapeutischem Potential zu identifizieren.

4.2.2 Endothelzellen

Zusätzlich zur Mikroglia wurden in dieser Arbeit auch die aus der Netzhaut isolierten CD31-positiven vaskulären Zellen untersucht. Ich konnte zeigen, dass in der Wildtyp-Retina Endothelzellen signifikant mehr VAMP5 als Neuronen exprimierten, was auch durch die scRNA Seq-Daten von Macosko et al. (2015) bestätigt wird (Kapitel 4.2.1, Abb. 29). Prinzipiell schienen sie alle VAMPs zu exprimieren mit Ausnahme von VAMP1, das in Endothelzellen

im Vergleich zu den anderen Fraktionen wenig bzw., unter Berücksichtigung der möglichen geringen Verunreinigung, möglicherweise gar nicht vorkommen könnte. Allerdings muss einschränkend hinzugefügt werden, dass sich aufgrund einer geringen Versuchszahl für VAMP1 keine signifikanten Ergebnisse ergaben und aufgrund dessen die Versuchszahl erhöht werden sollte (Kapitel 3.2.2.1 Abb. 15). Im Gegensatz dazu konnten Isenmann et al. (1998) zumindest in humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen durchaus VAMP1 nachweisen. Bisher gibt es nicht viele Studien zur VAMP-Expression in Endothelzellen. Studien außerhalb der Retina ergaben jedoch, dass aus der VAMP-Familie VAMP3 und VAMP8 endotheliale Exozytose zu vermitteln schienen (Pulido et al. 2011; Zhu et al. 2015). Die retinalen Endothelzellen zeigten zwischen den unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten Genotypen bezüglich Zelltyp-spezifischer Marker und VAMPs keine signifikanten Unterschiede (Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.3.4). Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass sich laut Expressionsanalysen vermutlich nicht alle Endothelzellen der Retina in der Endothelzellfraktion abbildeten, da sich auch einige Endothelzellen in der Müllerzellfraktion zu befinden schienen (Kapitel 3.1.2, Abb. 12).

Bisher ist noch unklar, was für Proteine in welchem Umfang Marker endothelialer Aktivierung in der Retina sind, sodass dies Gegenstand aktueller Forschung ist. Bekannt ist, dass Assoziationen zwischen endothelialer Aktivierung und Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette, Perizytenintegration, TNF-alpha-Aktivität und sogar eben angesprochener Mikrogliaaktivierung (Kapitel 4.2.1) bestehen (Lenin et al. 2018). Dies ist ein Anknüpfungspunkt für zukünftige Studien, die zu einem besserem Verständnis der Verbindung zwischen endothelialer Aktivierung und retinalen Krankheiten führen könnten (Yang et al. 2016; Lenin et al. 2018). Hierfür wäre es sinnvoll, die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen in mittels MACS®-Technik isolierten CD31-positiven vaskulären Zellen auszuweiten auf weitere Gene, insbesondere mögliche Markergene der endothelialen Aktivierung. Besonders vielversprechend erscheint hierbei der Vergleich zwischen der nativen Netzhaut und der genetisch veränderter Modelle, z. B. dem der diabetischen Retinopathie oder anderer neurodegenerativer Erkrankungen.

4.2.3 Neuronen

In partieller Abweichung zu den scRNA Seq-Ergebnissen von Macosko et al. (2015; Kapitel 4.2.1, Abb. 29) exprimierten die Neuronen der Netzhaut laut meiner Expressionsanalysen alle VAMPs (Kapitel 3.2.2.1, Abb. 15). Geht man allerdings von einer

möglichen geringen Verunreinigung im Rahmen des Zellisolationsprozesses aus, könnte VAMP5 hierzu die Ausnahme bilden und möglicherweise gar nicht in den retinalen Neuronen exprimiert werden, was sich mit den Daten von Macosko et al. (2015) decken würde (Kapitel 4.2.1, Abb. 29). Diese Ergebnisse und auch die Expression Zelltyp-spezifischer Marker in Neuronen stellten sich unabhängig vom Genotyp dar (Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.3.4).

Die retinale Neuronenfraktion setzt sich aus vielen verschiedenen Zelltypen, zum Beispiel Ganglienzellen, Zapfen und Stäbchen, zusammen. Diese besitzen teils sehr unterschiedliche Eigenschaften und Proteinexpressionen (Macosko et al. 2015; Kapitel 4.2.1, Abb. 29). Da deshalb pauschale Aussagen über die gesamte Neuronenfraktion nur von limitierter Aussagekraft scheinen, wäre es sinnvoll, diese vor weiterer Analyse in die unterschiedlichen Neuronenpopulationen aufzutrennen, beispielsweise mittels MACS®-Technik. Dies würde auch die Müllerzellen nicht in Mitleidenschaft ziehen, da sie schon vorher aus der Negativ- bzw. Neuronenfraktion isoliert werden. Gerade eine Isolation und konsekutive weitere Erforschung von Amakrinzellen wäre spannend, da sie in den histologischen Untersuchungen als einzige mit einer reduzierten Zellzahl auf den Knockout von VAMP7 reagierten, und zwar unabhängig vom Müllerzell-spezifischen Knockout anderer Gene (Kapitel 3.3.3.1, Abb. 23C). Dieses Phänomen schlug sich in den Expressionsanalysen nicht nieder, was dadurch zu erklären ist, dass die Amakrinzellen zahlenmäßig nur einen kleinen Teil der Gesamtneuronenzahl ausmachen. Hier machen Photorezeptoren die was die Anzahl betrifft größte Zellpopulation aus. Dies ist zugleich ein weiteres Argument dafür, die VAMP-Expressionsanalysen weiterführend in der aufgesplitteten Neuronenfraktion in den unterschiedlichen Genotypen zu untersuchen.

Bezüglich VGLUTs exprimierten Neuronen im Gegensatz zu den Müllerzellen mehr VGLUT1 und weniger VGLUT3, auch eine Expression von VGLUT2 lag vor (Kapitel 3.2.1, Abb. 14). Meine Daten stimmen damit hervorragend mit den Daten von Macosko et al. (2015) überein (Kapitel 4.2.1, Abb. 29). Die VGLUT3-Expression in Neuronen war unabhängig vom Genotyp der Maus (Wildtyp vs. VAMP7-KO, Kapitel 3.3.5, Abb. 28).

Diese Ergebnisse passen dazu, dass in anderen Studien VGLUT1 in präsynaptischen Nervenenden der IPS und ÄPS der Retina zu finden war (Johnson et al. 2003) und im Gegensatz dazu VGLUT2 nur gering in den synaptischen Endigungen von Photorezeptoren in der ÄPS (Wässle et al. 2006). Die diskrete Expression von VGLUT3 in Neuronen könnte dadurch bedingt sein, dass Amakrinzellen VGLUT3 exprimieren (Haverkamp und Wässle 2004;

Michalski et al. 2013; Macosko et al. 2015; Kapitel 4.2.1, Abb. 29), was ein weiterer Hinweis auf ihre Sonderstellung unter den Neuronen der Retina ist. Dies sollte weiter untersucht werden, zumal VGLUT3 einen unverzichtbaren Einfluss auf Synapsen zu haben scheint (Michalski et al. 2013; Kapitel 1.3.2).

Vergleicht man vorbestehende Daten aus der ischämischen Retina mit dem VAMP7-Knockout, zeigt sich in beiden Modellen eine besondere Anfälligkeit der Amakrinzellen für Störungen der retinalen Homöostase (Dijk et al. 2004; Kapitel 3.3.3.1), wobei sich dies im Ischämie-Modell über die Reduktion von VGLUT3 in Amakrinzellen darstellte (Michalski et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass auch der Knockout von VAMP7 zu Dysbalance in der Retina führte, die sich durch das Absterben der besonders empfindlichen Amakrinzellen darstellen ließ. Dagegen konnten keine Veränderungen der Müllerzellen im VAMP7-KO-Tier nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Amakrinzellen im Gegensatz zu Müllerzellen schlechtere Schutzmechanismen gegen mögliche Störungen der retinalen Homöostase haben. Um genannte Zusammenhänge/Hypothesen weiter zu untersuchen, sollten einerseits die Experimente mit Amakrinzellen im VAMP7-Knockout und andererseits die mit Müllerzell-VGLUT3 in der ischämischen Retina ausgeweitet werden.

4.3 Müllerzellen exprimieren wichtige Komponenten zur vesikulären Freisetzung von Glutamat

Der Hauptfokus dieser Dissertation lag auf der potentiellen VGLUT-, VAMP- und Exosomen-vermittelten exozytotischen Glutamatsekretion durch Müllerzellen und den zellulären Mechanismen hierzu.

4.3.1 Müllerzellen exprimieren insbesondere VGLUT3

Analog zu vorbestehenden Daten (Johnson et al. 2003; Wässle et al. 2006; Michalski et al. 2013) wurde in dieser Arbeit die Expression aller VGLUTs in der Retina nachgewiesen. Bei einer Versuchsanzahl von $n = 2$ wäre dabei eine Steigerung der Experimentanzahl wünschenswert, um etwaige Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen VGLUTs in der Gesamtretina zu detektieren. Erstmals gelang hier jedoch der Nachweis, dass auch Müllerzellen analog zu Astrozyten (Schubert et al. 2011; Parpura und Zorec 2010; Montana et al. 2006) alle drei VGLUTs auf Transkriptebene exprimierten.

Außerdem ließ sich in dieser Arbeit nachweisen, dass VGLUT3 - unabhängig vom VAMP7-Knockout - insbesondere in Müllerzellen exprimiert war (Kapitel 3.2.1, Abb. 14; Kapitel 3.3.5, Abb. 28; Abb. 30), was sich mit dem reanalysierten Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdatensatz

von Macosko et al. (2015) deckt (Kapitel 4.2.1, Abb. 29). Dies könnte zum einen bedeuten, dass VGLUTs in Müllerzellen möglicherweise unabhängig von bestimmten VAMPs exprimiert werden. Zum anderen ist es ein weiteres Indiz dafür, dass Müllerzellen vermutlich zur Kalzium-abhängigen Glutamatsekretion fähig sind, da VGLUT3 eine Schlüsselrolle bei der Kalzium-abhängigen Glutamatsekretion durch Astrozyten innehaltet (Ni und Parpura 2009; Kapitel 1.3.2). Eine Weiterführung der bisher nicht erfolgreichen Western Blot-Versuche mit VGLUT3 in Müllerzellen wäre deshalb sinnvoll. Erfolgversprechend wären zudem insbesondere Experimente mit Müllerzellen von VGLUT3-Knockout-Mäusen (Gras et al. 2008).

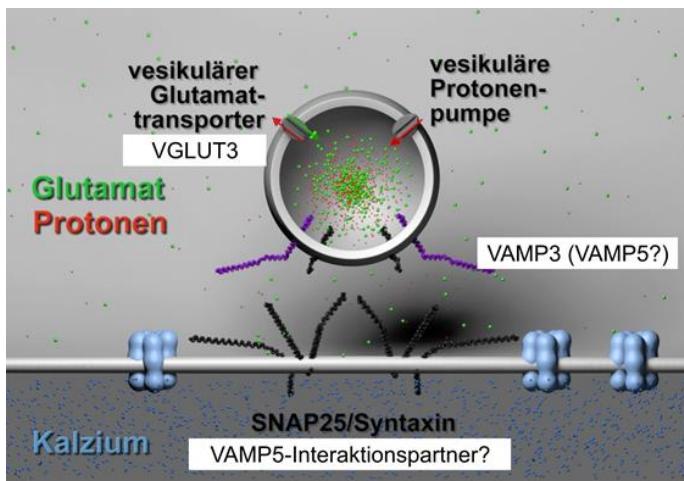


Abbildung 30: Müllerzellen exprimieren wichtige Moleküle zur Kalzium-abhängigen vesikulären Exozytose von Glutamat. Im Rahmen der Dissertation konnte erstmals erfolgreich die Expression eines Müllerzell-spezifischen vesikulären Glutamat-Transporters (VGLUT3), wie auch die Expression von mindestens zwei vesikulären SNARE-Proteinen (VAMP3/VAMP5) als Voraussetzung für die exozytotische Freisetzung von Glutamat nachgewiesen werden. Beziiglich VAMP5 ist allerdings eine Beteiligung auf Grund der fehlenden Interaktion mit SNAP25/Syntaxin bzw. fehlender Kenntnis alternativer Interaktionspartner im Zusammenhang der vesikulären Exozytose fraglich.

4.3.2 VAMP5 als entscheidendes Vesikel-assoziiertes Membranprotein in Müllerzellen

Vesikel-assoziierte Membranproteine sind ein zentraler Faktor für die vesikuläre Freisetzung von Transmittern wie Glutamat (Kapitel 1.3.1). Entsprechend intensiv habe ich dieses für die Kommunikation mit retinalen Neuronen wichtige molekulare Werkzeug der Müllerzelle untersucht.

Müllerzellen exprimierten in meinen Experimenten alle VAMPs. Vor allem VAMP5 schien dabei allerdings im Vergleich zu den Neuronen vornehmlich in Müllerzellen exprimiert zu sein (Kapitel 3.2.2.1, Abb. 15; Kapitel 4.3.1, Abb. 30) und in ihnen eine Sonderrolle einzunehmen. Die VAMP5-Expression in Müllerzellen konnte in dieser Dissertation sowohl auf Proteinebene mittels Western Blot (Kapitel 3.2.2.2, Abb. 16) als auch erstmals auf mikroskopischer Ebene mittels Licht- und Elektronenmikroskopie (Kapitel 3.2.2.4, Abb. 18) bestätigt werden. Dies deckt sich mit den qPCR-Vorlagen unserer Arbeitsgruppe zur VAMP5-Expression. In Bezug auf VAMP3 und VAMP7 wurde jedoch in den qPCR-Ergebnissen dieser Arbeit im Gegensatz zu den Vorversuchen meiner Arbeitsgruppe keine signifikant höhere Expression in Müllerzellen als in den Restzellen der Retina detektiert. Allerdings konnte teilweise nur eine

kleine Versuchszahl verwendet werden. Außerdem stand trotz mehrerer Experimente zur Etablierung eines passenden *housekeeping*-Gens für die TaqMan®-Analysen noch kein hierfür geeignetes Protein zur Verfügung. Typischerweise zum Einsatz kommende Gene wie beispielsweise Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase oder Aktin wiesen eine signifikant unterschiedliche Expression zwischen aufgereinigten Müllerzellen und der neuronalen Fraktion auf (Pauly et al. 2019). Mittlerweile konnten jedoch Pdhb (Pyruvatdehydrogenase beta) und Idh3b (Isocitratdehydrogenase 3 [NAD+] beta) als *Housekeeper* validiert werden (Pauly et al. 2019), sodass weitere Experimente hierzu mit einer gesteigerten Versuchszahl und unter Verwendung der neuen *Housekeeper* sinnvoll wären.

Weder der isolierte Knockout von VAMP7 noch der gleichzeitige Müllerzell-spezifische Knockout von VAMP1-3 führten in Müllerzellen zu einer kompensatorischen Hoch- oder Herunterregulierung der anderen VAMPs (Kapitel 3.3.4, Abb. 26) oder von VGLUT3 (Kapitel 3.3.5, Abb. 28; VGLUT3 wurde nur im VAMP7-KO-Genotyp untersucht), was gegen die Redundanz dieser Proteine sprechen würde. Diesbezüglich existieren in der Literatur unterschiedliche Daten. Einerseits postulierten Ergebnisse aus Experimenten in anderen Zelltypen für einzelne VAMPs eine Redundanz und somit eine gegenseitige Kompensation im Falle eines Funktionsverlusts (Borisovska et al. 2005; Hasan et al. 2010). Andere Studien allerdings schrieben z.B. VAMP1 an der neuromuskulären Endplatte (Liu et al. 2011b) eine nicht-redundante Rolle zu. Zusätzlich ergaben sich beispielsweise auch Hinweise auf eine Form von „gewichteter Redundanz“ für VAMP8 in Thrombozyten (Ren et al. 2007). Da sich diese Studien allerdings jeweils auf sehr unterschiedliche Zellen bezogen, erscheint hier ein Vergleich nur bedingt aussagekräftig und weitere Studien sind nötig, um meine Ergebnisse zur Redundanz von VAMPs in Müllerzellen zu validieren.

Neben den Experimenten in Wildtyp- und transgenen Mäusen ist es von Interesse, herauszufinden, ob Müllerzellen der transgenen Maus möglicherweise schlechter auf Zellstress reagieren können. Dazu sollten Analysen künftig auch in der kranken transgenen Maus, z. B. im Mausmodell der diabetischen Retinopathie oder der retinalen Ischämie, durchgeführt werden.

Da VAMP5 verglichen mit Neuronen vor allem in Müllerzellen exprimiert zu sein schien, ist es ein wichtiger potenzieller Faktor für die Mitwirkung an der Exozytose aus Müllerzellen. Darum konzentrierten sich weitere Analysen auf VAMP5 als mögliches die Müllerzelle zur Exozytose befähigendes VAMP.

Aus den Ergebnissen der Immunpräzipitation mit dem gegen VAMP5-gerichteten Antikörper (Kapitel 3.2.2.3) lassen sich einige erstaunliche Thesen ableiten. Zunächst war festzustellen, dass das VAMP5 der Müllerzelle außergewöhnlich viele Interaktionen mit anderen Proteinen einzugehen schien (Kapitel 3.2.2.3, Abb. 17). Das könnte bedeuten, dass es einerseits für viele andere Proteine wichtiger Bezugspartner ist und eine zentrale Rolle in der Maschinerie der Müllerzelle einnimmt. Andererseits besagt dieser Umstand möglicherweise, dass VAMP5 selbst einige andere Proteine braucht, um seine Aufgaben in der Zelle adäquat ausführen zu können. Am wahrscheinlichsten ist hier wohl eine Kombination aus beiden Hypothesen, je nach interagierendem Protein.

Ein weiteres Argument für eine vesikuläre Freisetzung von Glutamat durch Müllerzellen ist, dass in der Immunpräzipitation (Kapitel 3.2.2.3) viele Proteine mit VAMP5 ko-präzipitierten, die eine Exozytose betreibende Zelle für sekretorische Prozesse benötigt:

Zusammengefasst sind die ko-präzipitierten Sv2a (*Synaptic vesicle glycoprotein 2 a*) und Gephyrin Modulatoren der Neurotransmission. Sv2a ist außerdem ein Regulator von Zellsekretion und Vesikelfusionierung. Scamp5 (*Secretory carrier membrane protein 5*) ko-präzipitierte und wird benötigt für eine Kalzium-abhängige Exozytose von Zytokinen, es arbeitet vermutlich in Kooperation mit der SNARE-Maschinerie. Überdies ist auch das sich ebenfalls auf der Liste befindliche Snx18 (*Sorting nexin 18*) an intrazellulären Transportprozessen beteiligt. Zuletzt ist Gnb2l1 (*Guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2 like 1*) zu nennen, welches involviert ist in die Rekrutierung, Gruppierung und Regulierung von vielen Signalmolekülen. Als Regulatoren vesikulärer Transportprozesse innerhalb der Zelle werden die ko-präzipitierten Proteine der Sec-Familie (Sec23b ko-präzipitierte im Verhältnis VAMP5/IgG >2; Sec23a, Sec24b, Sec24c, Sec 31a und Sec31b im Verhältnis VAMP5/IgG < 2) vermutlich für den Transport von sekretorischen und Membranproteinen vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat benötigt (Barlowe 1994; STRING Protein-Protein interaction networks).

Mit welchen *t-SNAREs* und Hilfsproteinen das *v-SNARE* VAMP5 interagiert, ist noch nicht sicher bekannt und könnte neue Erkenntnisse über Müllerzellen und insbesondere die vesikulären Sekretionsmechanismen in ihnen geben. Studien an COS-7-Zellen zeigten, dass VAMP5 im Gegensatz zu allen anderen VAMPs keine Membranfusion mit den *t-SNAREs* Syntaxin1/SNAP-25 und Syntaxin4/SNAP-25 einging (Hasan et al. 2010). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Dissertation für Syntaxin (Syntaxin1B) durchaus eine Ko-Präzipitation mit VAMP5 nachgewiesen werden, nicht jedoch für SNAP-25 und Syntaxin4.

Das würde dafür sprechen, dass die Exozytose durch Müllerzellen mittels VAMP5 womöglich über einen anderen, bisher noch unbekannten Signalweg funktioniert (Kapitel 4.3.1, Abb. 30). Vergleicht man die Daten der VAMP5-IP (Kapitel 3.2.2.3, Tab. 17) mit den für den Menschen bisher beschriebenen SNAREs (Hong 2005), ergeben sich als mögliche mit dem *v-SNARE* VAMP5 interagierende *t-SNAREs* Syntaxin1B, ebenso wie SNAP91, ein Protein der SNAP-Familie, aus der bisher allerdings nur SNAP-23, -25 und -29 im Menschen als SNAREs bekannt sind. Weitere mögliche Interaktionspartner von VAMP5 während der Membranfusion, die sich übereinstimmend mit der Liste von Hong (2005) finden, sind die mit VAMP5 ko-präzipitierten Proteine der Sec-Familie. Aus ihr sind allerdings bisher nur Sec20 und Sec22a-c als SNAREs beschrieben, wobei diese auch teilweise den *R-SNAREs* und teilweise noch keiner strukturellen Einheit zugeordnet sind.

Als zusätzlich benötigte Hilfsproteine und SNARE-Regulatoren (Wang et al. 2017) kommen beispielsweise die mit VAMP5 ko-präzipitierten Proteine NSF, Complexin IV, Synaptophysin und Synaptotagmin I in Frage, da diese auch von Hong (2005) im Menschen als SNARE-Regulatoren gelistet wurden. Für Syncrip (*Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein*) und Septin 7 gilt dies in abgewandelter Form, in diesen Fällen finden sich Synaptotagmin und Septin 5 als SNARE-Regulatoren in Hongs (2005) Datensatz wieder.

Genannte Proteine sind somit mögliche Interaktionspartner für VAMP5 bei der Exozytose und könnten in einem nächsten Schritt zunächst auf ihre Lokalisation in der Retina untersucht werden, gefolgt von weiteren funktionellen Tests.

Dass Müllerzell-VAMP5 auch mit Tumorsuppressorgen (Tmbo als nukleäre Verankerung des Tumorsuppressorgens RB1, außerdem St13, NDRG1) und dem Protoonkogen Ras (*Rab5b*) ko-präzipitierte, könnte in Zusammenhang stehen mit der für Exosomen (Kapitel 4.3.3) bekannten Verknüpfung mit Krankheiten wie z. B. Karzinomen (Kapitel 1.3.3).

Auch für Mikrotubuli-assoziierte Proteine (Tubb4a, Map6, Dynll1, Gphn und Ndrg1) und Mvb12b (*Multivesicular body subunit 12B*) ergab sich eine deutliche Ko-Präzipitation mit VAMP5. Dies unterstützt einerseits die im nächsten Kapitel dargestellte Exosomen-These (Kapitel 4.3.3), da Mikrotubuli und Mvb12b für die Exosomenfunktion und -entwicklung benötigt werden, und zwar Mikrotubuli als Transportmotor für mikrovesikuläre Körperchen, Mvb12b zur Sortierung endozytotischer Partikel in multivesikuläre Körperchen (Kapitel 1.3.3). Andererseits dienen Mikrotubuli z. B. Motorproteinen als „Schienen“ durch die Zelle, auf denen der Vesikeltransport stattfindet (Liu 2017; Goodson und Jonasson 2018). Mikrotubuli

könnten also mögliche Interaktionspartner der VAMPs in Müllerzellen zur Unterstützung intrazellulärer Vesikeltransportprozesse und konsekutiver exozytotischer Sekretion sein.

Möchte man die VAMP5-Immunpräzipitations-Daten gezielt mit bestehenden Datensets zu extrazellulären Vesikeln vergleichen, sind die wichtigsten Datenbanken hierzu unter anderem Vesiclepedia (Kalra et al. 2012; Vesiclepedia Database), Exocarta (Keerthikumar et al. 2016; ExoCarta) und die Plasma Proteome Database (Marchaland et al. 2008; Nanjappa et al. 2014; Plasma Proteome Database). Diese stellen Informationen zu Proteinen, Lipiden und RNA bereit, welche in einigen Präparationen mit extrazellulären Vesikeln interagierten und unterscheiden sich jeweils deutlich in den identifizierten Proteinen (Rosa-Fernandes et al. 2017).

Die eben erwähnten Proteine kommen fast alle in der Gesamtliste der mit Exosomen assoziierten Proteine aus der Exocarta (Keerthikumar et al. 2016; ExoCarta) vor (Syt1, Syncrip, Sec, Stx1b, Nsf, Sept7, Syp). Vergleicht man beispielhaft die VAMP5-IP-Daten mit den 100 häufigsten Interaktionspartnern von Exosomen laut Exocarta, zeigen sich ebenfalls einige Übereinstimmungen, zum Beispiel Rab5b, CCT2, Clathrin, Slc, Gnb, Tub und weitere. Dies könnte darauf hindeuten, dass Müllerzell-VAMP5 mit vielen Exosomen-assoziierten Proteinen interagiert und Exosomen somit ein möglicher VAMP5-assozierter Sekretionsmechanismus sind.

4.3.3 Exosomen – von Müllerzellen freigesetzte Transportvehikel zur Gliotransmission?

Ergänzend zu den proteomischen Daten von Müllerzellen, die einen Bezug von Müllerzellproteinen zu extrazellulären vesikulären Exosomen nachwiesen (Grosche et al. 2016), ging folglich aus meinen Immunpräzipitationsanalysen (Kapitel 3.2.2.3) hervor, dass Exosomen ein Exozytosewerkzeug der Müllerzelle sein könnten.

In meiner Dissertation wurden deshalb Müllerzellen kulturiert und zwei Exosomen-Isolationsprotokolle miteinander verglichen (Kapitel 3.2.3). Im Anschluss konnte mittels des von mir etablierten Western Blot-Protokolls erstmals auf Proteinebene bewiesen werden, dass Müllerzellen Exosomen sezernierten, die im Rahmen meiner Arbeit erfolgreich aus ihrer Kultur isoliert werden konnten (Kapitel 3.2.3, Abb. 19). Dies konnte mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden (3.2.2.4, Abb. 18C).

Ebenso konnte elektronenmikroskopisch eine Kolokalisation von Müllerzell-Exosomen und VAMP5 demonstriert werden (Kapitel 3.2.2.4, Abb. 18C). Da sich VAMP5 lichtmikroskopisch innerhalb der Müllerzelle gleichmäßig in vesikulären Strukturen nachweisen ließ und es sich

elektronenmikroskopisch sowohl in Endfüßen als auch in von Endfüßen sezernierten vesikelförmigen Strukturen abbildete, könnte es sich bei den beschriebenen vesikulären Strukturen um Exosomen handeln (Kapitel 3.2.2.4, Abb. 18A+B). Dabei scheint VAMP5 mit Exosomen zu interagieren, mit ihrer Freisetzung assoziiert und womöglich sogar Teil der Exosomenmembran zu sein. Für den genauen Zusammenhang zwischen VAMP5 und Exosomen weisen die hier vorgestellten Daten somit erstmals darauf hin, dass Müllerzellen Exosomen freisetzen, die sie, in Anbetracht ihrer Kolokalisation mit dem SNARE VAMP5, womöglich zu einer weiteren Form der Zell-Zell-Kommunikation zusätzlich zur Calcium-abhängigen schnellen Exozytose befähigen. Wie die Exosomen-Freisetzung allerdings getriggert sein könnte, ist dabei noch offen und gibt Anlass zu weiteren Experimenten. Ebenso ist noch unklar, ob Exosomen Neurotransmitter tragen, was bislang auch in Astrozyten noch nicht bestätigt werden konnte (Verkhratsky et al. 2016). Bisher ist bekannt, dass astrozytäre Exosomen Proteine, Nukleinsäuren und Lipide transportieren und vermutlich EAAT-1 und -2 (*excitatory amino-acid transporters*) sowie Glutaminsynthetase exprimieren, was zumindest auf eine Befähigung zur Neurotransmitterausstattung hindeuten könnte (Gosselin et al. 2013).

Es existieren bereits vielversprechende Studien zur möglichen Nutzung von Exosomen als Biomarker (Joyce et al. 2016; Lawson et al. 2016; Rastogi et al. 2021; Kapitel 1.3.3). Zur Nutzung in Bezug auf ophthalmologische Erkrankungen könnten Exosomen potentiell aus Tränenflüssigkeit (Grigor'eva et al. 2016), Kammerwasser (Kang et al. 2014; Dismuke et al. 2015), dem Glaskörper (Ragusa et al. 2015) und Blut (Eldh et al. 2014) als Biomarker isoliert werden. Allerdings ist beispielsweise aktuell noch nicht klar, ob Exosomen, die von retinalen Zellen sezerniert werden, überhaupt ins Kammerwasser gelangen können (Klingeborn et al. 2017). Da sowohl Müllerzellen als auch Exosomen eine Rolle bei ophthalmologischen Krankheiten spielen (Jakobiec et al. 1983; Hauck et al. 2007; Coughlin et al. 2017; Ghaseminejad et al. 2020; Liu et al. 2020; Li et al. 2020; Han et al. 2021), wäre es interessant, zu wissen, ob die von Müllerzellen freigesetzten Exosomen als Biomarker und therapeutische Vehikel für diese Erkrankungen dienen könnten, was die Relevanz ihrer Erforschung noch weiter untermauert.

Ergänzend würde ein Western Blot von VAMP5 in Müllerzell-Exosomen eine sinnvolle Vervollständigung der erhobenen Daten darstellen, die in folgenden Studien aufgegriffen werden sollte. Da Western Blot-Versuche mit dem Exosomenmarker CD9 bislang nicht erfolgreich waren, könnte man neben dem bisher in dieser Arbeit etablierten CD63-Blot zusätzlich Western Blots für den Exosomenmarker CD81 (Peterson et al. 2015) erproben.

Außerdem wäre die Frage zu klären, ob VGLUTs ebenfalls mit Exosomen assoziiert sind und womöglich ein Teil der Exosomenmembran sein könnten.

Weiterführend wären eben beschriebene Versuche an Müllerzellen im VAMP5-KO-Tier (Ikezawa et al. 2018) konstruktiv für die weitere Erforschung von Exosomen, VAMPs und Müllerzellen und würden einen vielversprechenden Forschungsansatz für die Zukunft darstellen.

5. Zusammenfassung

In meiner Doktorarbeit wurden vesikuläre Sekretionsmechanismen in Müllerzellen anhand der hierfür nötigen molekularen Grundlagen erforscht sowie neue Aussagen über Mikrogliazellen, Neuronen und Endothelzellen der Retina getroffen.

Dies erfolgte mittels histologischer Präparationen, Immunfluoreszenzfärbungen, Konfokalmikroskopie, MACS®-Technik, RNA-Isolationen, cDNA-Synthesen und Genotypisierungs-PCRs sowie TaqMan®-PCRs. Eingesetzt wurden außerdem Proteinisolationen, darunter auch die Membranproteingewinnung, weiterführende Western Blots, die Technik der Immunpräzipitation, die Zellkulturierung sowie Exosomenisolationen.

Erstmals wurden ein neu generiertes triple-transgenes Tier (Müllerzell-spezifischer Knockout von VAMP1-3, gekreuzt mit VAMP7-KO-Mäusen) sowie Müllerzellen im VAMP7-Knockout-Tier erforscht. Des Weiteren konnten das SNARE VAMP3 und erstmals auch VAMP5 sowie VAMP7 in der Mausretina auf Proteinebene nachgewiesen werden, VAMP5 erstmalig als Müllerzellprotein.

Ein Protokoll zur Müllerzellisolation aus der Netzhaut wurde weiterentwickelt und dessen Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit mit mehreren Methoden bewiesen, wodurch sich die Aussagekräftigkeit der darauf aufbauenden Analysen bestätigt und verbessert hat. Auf gleichem Wege ließen sich spezifisch auch die restlichen Zellfraktionen der Retina gewinnen und analysieren.

Hierdurch wurde die Aussage möglich, dass Mikrogliazellen der Netzhaut vermutlich alle VAMPs sowie VGLUT3 exprimieren. Der Knockout von VAMP7 bzw. der Müllerzell-spezifische Knockout von VAMP1-3 hatte in den untersuchten Tests keinen Einfluss auf die Mikrogliazellen, weder auf morphologischer bzw. histologischer Ebene noch in Bezug auf die Expression der verbleibenden VAMPs, VGLUT3 oder Zelltyp-spezifischer Marker. Die histologisch im Wildtyp gewonnenen Daten passen größtenteils zu den Ergebnissen bereits bestehender Literatur. Allerdings bestand entgegen dort beschriebener Zahlen in meinen Analysen kein Unterschied zwischen den Mikroglia-Zellzahlen in innerer und äußerer plexiformer Schicht und war in den Versuchen dieser Arbeit die in der Wildtyp-Maus von Mikroglia okkupierte Fläche in der inneren plexiformen Schicht größer als in der äußeren.

Auch die Endothelzellen der Mausnetzhaut schienen alle VAMPs, insbesondere VAMP4, zu exprimieren, und zwar unabhängig vom Genotyp der Maus.

Mikrogliaaktivierung ist eng mit einer Degeneration in der Retina assoziiert und endotheliale Aktivierung könnte an der Initiierung und Ausdehnung neurovaskulärer Erkrankungen beteiligt sein, sodass auf den hier dargestellten Daten aufbauende weiterführende Analysen therapeutische Ansatzpunkte in Bezug auf diese Erkrankungen liefern könnten.

Die Neuronen der Netzhaut exprimierten kein oder wenig VAMP5, ansonsten aber alle anderen VAMPs. Weder im VAMP7-Knockout noch im triple-transgenen Tier kam es zu kompensatorischen Expressionsveränderungen nicht targetierter VAMP-Isoformen. Die bereits bestehende Annahme, dass vor allem VGLUT1, aber auch VGLUT2 und VGLUT3 in Neuronen der Retina exprimiert werden, konnte in meiner Arbeit bestätigt werden. Unter den Neuronen scheinen die Amakrinzellen eine Sonderrolle einzunehmen, da sie auf histologischer Ebene als einzige mit einer reduzierten Zellzahl auf den Knockout von VAMP7 reagierten, was unabhängig vom Müllerzell-spezifischen Knockout anderer Gene war. Außerdem ist bereits gezeigt worden, dass sie wie die Müllerzellen VGLUT3 exprimieren. Dies gibt Anlass für ihre weitere Erforschung bezüglich ihrer Rolle in der Retina und den Interaktionen mit Müllerzellen, z. B. mittels gesonderter Isolation aus der Neuronenfraktion.

Müllerzellen der Netzhaut verfügen über nötige molekulare Grundlagen zur exozytotischen Vesikelfreisetzung von Glutamat, was Gliotransmission durch Müllerzellen entgegen kritischer Stimmen (Fiacco und McCarthy 2018) sehr wahrscheinlich macht. Dadurch können sie die Signalverarbeitung von Nervenzellen mutmaßlich direkt beeinflussen, beispielsweise im Sinne einer *tripartiten Synapse*. Eine Schlüsselrolle bei diesen molekularen Grundlagen scheinen Exosomen, VGLUT3 sowie VAMP3 und/oder VAMP5 zu spielen. Womöglich lassen sich diese Rückschlüsse auch auf andere Gliazellen des ZNS übertragen, da Müllerzellen als Modellglia fungieren können (Kapitel 1.2).

Erstmals wurde hier gezeigt, dass Müllerzellen alle drei VGLUTs exprimierten, und zwar insbesondere VGLUT3, dem eine Schlüsselrolle in der Kalzium-abhängigen Glutamatsekretion zugeschrieben wird.

Müllerzellen exprimierten im Vergleich zu Neuronen insbesondere VAMP5, und das unabhängig vom untersuchten Genotyp. VAMP5 scheint also eine Schlüsselrolle bei der Exozytose durch Müllerzellen zu spielen. Es befindet sich in vesikulären Strukturen, welche die Müllerzelle vermutlich sezerniert, die sie jedoch auch in ihren Endfüßen und gleichmäßig in der gesamten Zelle trägt. Außerdem scheint es viele Interaktionen mit anderen Proteinen einzugehen, die für sekretorische Prozesse benötigt werden. Mikrotubuli-assozierte Proteine

ko-präzipitierten ebenfalls mit VAMP5 und könnten Teil der Exozytose-Maschinerie in Müllerzellen sein. Ich konnte außerdem erstmals Syntaxin1B, SNAP91 und Proteine der Sec-Familie als mögliche *t-SNAREs* der VAMP5-vermittelten Kommunikation von Zellen mittels Transportvesikeln identifizieren, wobei NSF, Complexin IV, Synaptophysin, Synaptotagmin I, Syncrip (*Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein*) und Septin 7 hierfür mögliche Hilfsproteine wären. Eine Validierung dieser vielfältigen Interaktionen sollte in weiterführenden Untersuchungen erfolgen.

Einige dieser mit VAMP5 ko-präzipitierten Proteine sind Exosomen-assoziiert. Außerdem zeigte sich eine Ko-Präzipitation von VAMP5 mit vielen weiteren Exosomen-assoziierten Proteinen, sodass letztlich erstmals postuliert werden kann, dass Müllerzell-Exozytose und somit Gliotransmission durch Müllerzellen Exosomen- und VAMP5-vermittelt ablaufen könnte. Die erfolgreiche Isolation von Exosomen aus Müllerzellkulturen und ihr erstmaliger Nachweis auf Proteinebene sowie in der Elektronenmikroskopie untermauern diese These ebenso wie die Tatsache, dass VAMP5 und Exosomen auf elektronenmikroskopischer Ebene kolokalisiert waren.

Somit leistet diese Dissertation auf Zell- und molekularer Ebene einen Beitrag zur weiteren Erforschung der Retina, der Müllerzelle und von Gliazellen im Allgemeinen sowie von Exosomen, VGLUTs und VAMPs.

Bedenkt man die in meiner Arbeit beschriebenen Daten, wird klar, dass nicht nur neuronale Prozesse, sondern auch die glialen Aktionen ein Angriffspunkt für das Verständnis und die Therapie neuronaler bzw. ophthalmologischer Erkrankungen sein können und sollten. Insbesondere Exosomen als zellfreies Vehikel könnten ungeahnt an pathologischen Prozessen und Krankheitsentstehung beteiligt sein und bieten einen vielversprechenden Ansatz als therapeutisches Werkzeug bei diesen Erkrankungen sowie gleichzeitig die Möglichkeit, der Grundlagenforschung in diesem Bereich den Weg zum medizinischen Nutzen zu ebnen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AS: Aminosäure

ATP: Adenosintriphosphat

ÄKS: äußere Körnerschicht

ÄLM: äußere limitierende Membran

ÄPS: äußere plexiforme Schicht

BoNT: Botulinumtoxin

BoNT/B: *clostridial botulinum neurotoxin serotype B light chain*

CreER^{T2}: *Tamoxifen-inducible Cre recombinase*

EAAT: *excitatory amino-acid transporter*

EZL: Extrazelluläre Lösung

GABA: Gamma-Aminobuttersäure

GAT: GABA-Transporter

GDE: *glia-derived exosomes*

GLT: Glutamat-Transporter

GLUT: Glutaminsynthetase

GZS: Ganglienzellschicht

Iba1: *ionized calcium binding adapter molecule 1*

iBot-Maus: bigenes Tier mit funktionellem Knockout von VAMP1-3 in Müllerzellen (CreER^{T2} x iBot-Transgen)

iBot x VAMP7-KO-Maus: triple-transgenes Tier mit funktionellem Knockout von VAMP1-3 in Müllerzellen vor einem VAMP7-defizienten Hintergrund (CreER^{T2} x iBot-Transgen x VAMP7-KO)

Icam2: *Intercellular Adhesion Molecule 2*

IKS: innere Körnerschicht

ILM: innere limitierende Membran

IP: Immunpräzipitation

IPS: innere plexiforme Schicht

MHC: *major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex

MVB: multivesikulärer Körper

ngs: *normal goat serum*

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

Nrl: *Neural retina-specific leucine zipper protein*

PFA: Paraformaldehyd

PKC-alpha: Proteinkinase C alpha

qPCR: *real-time quantitative PCR*

RPE: retinales Pigmentepithel

rpm: *rounds per minute*

scRNA Seq-Daten: Einzelzell-RNA-Sequenzier-Daten

SNAP-25: *synaptosomal-associated protein of 25 kDa*

SNARE: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

TNF α : Tumornekrosefaktor alpha

VAMP: vesikel-assoziiertes Membranprotein

VAMP7-KO: VAMP7-Knockout

VGLUT: vesikulärer Glutamat-Transporter

ZNS: zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

- Abak, Atefe; Abhari, Alireza; Rahimzadeh, Sevda (2018): Exosomes in cancer. Small vesicular transporters for cancer progression and metastasis, biomarkers in cancer therapeutics. In: *PeerJ* 6, e4763. DOI: 10.7717/peerj.4763.
- Agte, Silke; Junek, Stephan; Matthias, Sabrina; Ulbricht, Elke; Erdmann, Ines; Wurm, Antje et al. (2011): Müller glial cell-provided cellular light guidance through the vital guinea-pig retina. In: *Biophysical journal* 101 (11), S. 2611–2619. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.09.062.
- Aheget, Houssam; Mazini, Loubna; Martin, Francisco; Belqat, Boutaina; Marchal, Juan Antonio; Benabdellah, Karim (2020): Exosomes. Their Role in Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Diseases. In: *Cancers*. DOI: 10.3390/cancers13010084.
- Araque, Alfonso; Carmignoto, Giorgio; Haydon, Philip G.; Oliet, Stéphane H. R.; Robitaille, Richard; Volterra, Andrea (2014): Gliotransmitters travel in time and space. In: *Neuron* 81 (4), S. 728–739. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.007.
- Araque, Alfonso; Navarrete, Marta (2010): Glial cells in neuronal network function. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 365 (1551), S. 2375–2381. DOI: 10.1098/rstb.2009.0313.
- Araque, Alfonso; Parpura, Vladimir; Sanzgiri, Rita P.; Haydon, Philip G. (1999): Tripartite synapses. Glia, the unacknowledged partner. In: *Trends in neurosciences* 22 (5), S. 208–215. DOI: 10.1016/S0166-2236(98)01349-6.
- Arenaccio, Claudia; Federico, Maurizio (2017): The Multifaceted Functions of Exosomes in Health and Disease. An Overview. In: *Advances in experimental medicine and biology* 998, S. 3–19. DOI: 10.1007/978-981-10-4397-0_1.
- Barlowe, C. (1994): COPII. A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. In: *Cell* 77 (6), S. 895–907. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90138-4.
- Barnett, Nigel L.; Pow, David V.; Robinson, Stephen R. (2000): Inhibition of Müller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. In: *Glia* 30 (1), S. 64–73. DOI: 10.1002/(sici)1098-1136(200003)30:1<64::aid-glia7>3.0.co;2-i.
- Bear, Mark F.; Connors, Barry W.; Paradiso, Michael A. (2018): Neurowissenschaften. Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie. 4. Aufl. 2018. Hg. v. Andreas K. Engel. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/978-3-662-57263-4>.
- Behar-Cohen, Francine; Gelizé, Emmanuelle; Jonet, Laurent; Lassiaz, Patricia (2020): Anatomie de la rétine. In: *Medecine sciences : M/S* 36 (6-7), S. 594–599. DOI: 10.1051/medsci/2020094.
- Behrends, Jan C. (2010): Physiologie. 93 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Behrends, Jan C.; Bischofberger, Josef; Deutzmann, Rainer; Ehmke, Heimo; Frings, Stephan; Grissmer, Stephan et al. (2017): Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Ben Achour, Sarrah; Pascual, Olivier (2012): Astrocyte-neuron communication. Functional consequences. In: *Neurochemical research* 37 (11), S. 2464–2473. DOI: 10.1007/s11064-012-0807-0.

- Bezzi, P.; Carmignoto, G.; Pasti, L.; Vesce, S.; Rossi, D.; Rizzini, B. L. et al. (1998): Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. In: *Nature* 391 (6664), S. 281–285. DOI: 10.1038/34651.
- Bezzi, P.; Domercq, M.; Brambilla, L.; Galli, R.; Schols, D.; Clercq, E. de et al. (2001): CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha. Amplification by microglia triggers neurotoxicity. In: *Nature neuroscience* 4 (7), S. 702–710. DOI: 10.1038/89490.
- Bezzi, Paola; Gundersen, Vidar; Galbete, José Luis; Seifert, Gerald; Steinhäuser, Christian; Pilati, Ethel; Volterra, Andrea (2004): Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. In: *Nature neuroscience* 7 (6), S. 613–620. DOI: 10.1038/nn1246.
- Bhatnagar, Sanchita; Schorey, Jeffrey S. (2007): Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. In: *The Journal of biological chemistry*, S. 25779–25789. DOI: 10.1074/jbc.M702277200.
- Biedermann, Bernd; Bringmann, Andreas; Reichenbach, Andreas (2002): High-affinity GABA uptake in retinal glial (Müller) cells of the guinea pig. Electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency. In: *Glia* 39 (3), S. 217–228. DOI: 10.1002/glia.10097.
- Blanchard, Nicolas; Lankar, Danielle; Faure, Florence; Regnault, Armelle; Dumont, Céline; Raposo, Graça; Hivroz, Claire (2002): TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168 (7), S. 3235–3241. DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3235.
- Bonifacino, Juan S.; Glick, Benjamin S. (2004): The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. In: *Cell* 116 (2), S. 153–166. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)01079-1.
- Borisovska, Maria; Zhao, Ying; Tsytsyura, Yaroslav; Glyvuk, Nataliya; Takamori, Shigeo; Matti, Ulf et al. (2005): v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. In: *The EMBO journal* 24 (12), S. 2114–2126. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600696.
- Bosco, Alejandra; Steele, Michael R.; Vetter, Monica L. (2011): Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. In: *The Journal of comparative neurology* 519 (4), S. 599–620. DOI: 10.1002/cne.22516.
- Bringmann, Andreas; Grosche, Antje; Pannicke, Thomas; Reichenbach, Andreas (2013): GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells. In: *Frontiers in endocrinology* 4, S. 48. DOI: 10.3389/fendo.2013.00048.
- Bringmann, Andreas; Iandiev, Ianors; Pannicke, Thomas; Wurm, Antje; Hollborn, Margrit; Wiedemann, Peter et al. (2009): Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis. Neuroprotective and detrimental effects. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (6), S. 423–451. DOI: 10.1016/j.preteyes.2009.07.001.
- Bringmann, Andreas; Pannicke, Thomas; Grosche, Jens; Francke, Mike; Wiedemann, Peter; Skatchkov, Serguei N. et al. (2006): Müller cells in the healthy and diseased retina. In: *Progress in retinal and eye research* 25 (4), S. 397–424. DOI: 10.1016/j.preteyes.2006.05.003.
- Brückner, Erik; Grosche, Antje; Pannicke, Thomas; Wiedemann, Peter; Reichenbach, Andreas; Bringmann, Andreas (2012): Mechanisms of VEGF- and glutamate-induced inhibition of osmotic swelling of murine retinal glial (Müller) cells. Indications for the involvement of vesicular glutamate release and connexin-mediated ATP release. In: *Neurochemical research* 37 (2), S. 268–278. DOI: 10.1007/s11064-011-0606-z.

- Cai, Huaqing; Reinisch, Karin; Ferro-Novick, Susan (2007): Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. In: *Developmental cell* 12 (5), S. 671–682. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.04.005.
- Chaineau, Mathilde; Danglot, Lydia; Galli, Thierry (2009): Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. In: *FEBS letters* 583 (23), S. 3817–3826. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.026.
- Coughlin, Brandon A.; Feenstra, Derrick J.; Mohr, Susanne (2017): Müller cells and diabetic retinopathy. In: *Vision research* 139, S. 93–100. DOI: 10.1016/j.visres.2017.03.013.
- Counil, Hermine; Krantic, Slavica (2020): Synaptic Activity and (Neuro)Inflammation in Alzheimer's Disease. Could Exosomes be an Additional Link? In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. DOI: 10.3233/JAD-191237.
- Cree, Bruce A. C.; Gourraud, Pierre-Antoine; Oksenberg, Jorge R.; Bevan, Carolyn; Crabtree-Hartman, Elizabeth; Gelfand, Jeffrey M. et al. (2016): Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. In: *Annals of neurology* 80 (4), S. 499–510. DOI: 10.1002/ana.24747.
- Cunha, S.; Amaral, M. H.; Lobo, J. M. Sousa; Silva, A. C. (2016): Therapeutic Strategies for Alzheimer's and Parkinson's Diseases by Means of Drug Delivery Systems. In: *CMC* 23 (31), S. 3618–3631. DOI: 10.2174/0929867323666160824162401.
- Dai, Shengming; Wei, Dong; Wu, Zhen; Zhou, Xiangyang; Wei, Xiaomou; Huang, Haixin; Li, Guisheng (2008): Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (4), S. 782–790. DOI: 10.1038/mt.2008.1.
- Danglot, Lydia; Zylbersztein, Kathleen; Petkovic, Maja; Gauberti, Maxime; Meziane, Hamid; Combe, Roy et al. (2012): Absence of TI-VAMP/Vamp7 leads to increased anxiety in mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (6), S. 1962–1968. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4436-11.2012.
- Denzer, K.; Kleijmeer, M. J.; Heijnen, H. F.; Stoorvogel, W.; Geuze, H. J. (2000): Exosome. From internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. In: *Journal of cell science* 113 Pt 19, S. 3365–3374.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (27.10.2016): Multiple Sklerose – Mehr Patienten leben ohne Behinderungen.
- Dijk, Frederike; van Leeuwen, Selina; Kamphuis, Willem (2004): Differential effects of ischemia/reperfusion on amacrine cell subtype-specific transcript levels in the rat retina. In: *Brain research* 1026 (2), S. 194–204. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.08.034.
- Dismuke, W. Michael; Challa, Pratap; Navarro, Iris; Stamer, W. Daniel; Liu, Yutao (2015): Human aqueous humor exosomes. In: *Experimental eye research* 132, S. 73–77. DOI: 10.1016/j.exer.2015.01.019.
- Eldh, Maria; Olofsson Bagge, Roger; Lässer, Cecilia; Svanvik, Joar; Sjöstrand, Margareta; Mattsson, Jan et al. (2014): MicroRNA in exosomes isolated directly from the liver circulation in patients with metastatic uveal melanoma. In: *BMC cancer* 14, S. 962. DOI: 10.1186/1471-2407-14-962.
- European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Protein Information Resource (PIR) (Hg.): Universal Protein Resource (UniProt) Knowledgebase. Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org>, zuletzt geprüft am 10.03.2021.

ExoCarta. Hg. v. Department of Biochemistry, La Trobe Institute for Molecular Science, La Trobe University, Bundoora, Victoria, Australien. Online verfügbar unter www.exocarta.org, zuletzt geprüft am 10.03.2021.

Farjo, Q.; Jackson, A. U.; Xu, J.; Gryzenia, M.; Skolnick, C.; Agarwal, N.; Swaroop, A. (1993): Molecular characterization of the murine neural retina leucine zipper gene, Nrl. In: *Genomics* 18 (2), S. 216–222. DOI: 10.1006/geno.1993.1458.

Fasshauer, Dirk (2003): Structural insights into the SNARE mechanism. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1641 (2-3), S. 87–97. DOI: 10.1016/S0167-4889(03)00090-9.

Fauré, J.; Lachenal, G.; Court, M.; Hirrlinger, J.; Chatellard-Causse, C.; Blot, B. et al. (2006): Exosomes are released by cultured cortical neurones. In: *Molecular and cellular neurosciences* 31 (4), S. 642–648. DOI: 10.1016/j.mcn.2005.12.003.

Février, Benoit; Raposo, Graça (2004): Exosomes. Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. In: *Current opinion in cell biology* 16 (4), S. 415–421. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.06.003.

Fiacco, Todd A.; McCarthy, Ken D. (2018): Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 38 (1), S. 3–13. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0016-17.2017.

Francke, M.; Makarov, F.; Kacza, J.; Seeger, J.; Wendt, S.; Gärtner, U. et al. (2001): Retinal pigment epithelium melanin granules are phagocytized by Müller glial cells in experimental retinal detachment. In: *Journal of neurocytology* 30 (2), S. 131–136. DOI: 10.1023/a:1011987107034.

Franze, Kristian; Grosche, Jens; Skatchkov, Serguei N.; Schinkinger, Stefan; Foja, Christian; Schild, Detlev et al. (2007): Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (20), S. 8287–8292. DOI: 10.1073/pnas.0611180104.

Fritschy, Jean-Marc; Harvey, Robert J.; Schwarz, Günter (2008): Gephyrin. Where do we stand, where do we go? In: *Trends in neurosciences* 31 (5), S. 257–264. DOI: 10.1016/j.tins.2008.02.006.

Fröhlich, Dominik; Kuo, Wen Ping; Frühbeis, Carsten; Sun, Jyh-Jang; Zehendner, Christoph M.; Luhmann, Heiko J. et al. (2014): Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons. Impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369 (1652). DOI: 10.1098/rstb.2013.0510.

Frühbeis, Carsten; Fröhlich, Dominik; Kuo, Wen Ping; Amphornrat, Jesa; Thilemann, Sebastian; Saab, Aiman S. et al. (2013): Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. In: *PLoS biology* 11 (7), e1001604. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001604.

Ghaseminejad, Farhad; Kaplan, Lew; Pfaller, Anna M.; Hauck, Stefanie M.; Grosche, Antje (2020): The role of Müller cell glucocorticoid signaling in diabetic retinopathy. In: *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 258 (2), S. 221–230. DOI: 10.1007/s00417-019-04521-w.

Goodson, Holly V.; Jonasson, Erin M. (2018): Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a022608.

Gosselin, Romain-Daniel; Meylan, Patrick; Decosterd, Isabelle (2013): Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters. Regulation by protein kinase C and cell activation. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 7, S. 251. DOI: 10.3389/fncel.2013.00251.

Gras, Christelle; Amilhon, Bénédicte; Lepicard, Eve M.; Poirel, Odile; Vinatier, Jacqueline; Herbin, Marc et al. (2008): The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. In: *Nature neuroscience* 11 (3), S. 292–300. DOI: 10.1038/nn2052.

Grigor'eva, A. E.; Tamkovich, S. N.; Eremina, A. V.; Tupikin, A. E.; Kabilov, M. R.; Chernykh, V. V. et al. (2016): Characteristics of exosomes and microparticles discovered in human tears. In: *Biomeditsinskaia khimiia* 62 (1), S. 99–106. DOI: 10.18097/PBMC20166201099.

Grosche, Antje (2013): Gliotransmitterfunktion in der Volumenregulation von Müllerschen Gliazellen der Netzhaut. Habilitationsschrift. Universität Leipzig, Leipzig. Medizinische Fakultät. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:15-qucosa-105141>.

Grosche, Antje; Hauser, Alexandra; Lepper, Marlen Franziska; Mayo, Rebecca; Toerne, Christine von; Merl-Pham, Juliane; Hauck, Stefanie M. (2016): The Proteome of Native Adult Müller Glial Cells From Murine Retina. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15 (2), S. 462–480. DOI: 10.1074/mcp.M115.052183.

Grützkau, Andreas; Radbruch, Andreas (2010): Small but mighty. How the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77 (7), S. 643–647. DOI: 10.1002/cyto.a.20918.

Halassa, Michael M.; Haydon, Philip G. (2010): Integrated brain circuits. Astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. In: *Annual review of physiology* 72, S. 335–355. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135843.

Hamilton, Nicola B.; Attwell, David (2010): Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? In: *Nature reviews. Neuroscience* 11 (4), S. 227–238. DOI: 10.1038/nrn2803.

Han, Jeong-Sun; Kim, Sung Eun; Jin, Jun-Qing; Park, Na Ri; Lee, Ji-Young; Kim, Hong Lim et al. (2021): Tear-Derived Exosome Proteins Are Increased in Patients with Thyroid Eye Disease. In: *IJMS* 22 (3), S. 1115. DOI: 10.3390/ijms22031115.

Harada, Takayuki; Harada, Chikako; Kohsaka, Shinichi; Wada, Etsuko; Yoshida, Kazuhiko; Ohno, Shigeaki et al. (2002): Microglia–Müller Glia Cell Interactions Control Neurotrophic Factor Production during Light-Induced Retinal Degeneration. In: *J. Neurosci.* 22 (21), S. 9228–9236. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09228.2002.

Harrell, C. Randall; Simovic Markovic, Bojana; Fellabaum, Crissy; Arsenijevic, Aleksandar; Djonov, Valentin; Arsenijevic, Nebojsa; Volarevic, Vladislav (2018): Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in the Treatment of Eye Diseases. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1089, S. 47–57. DOI: 10.1007/5584_2018_219.

Hasan, Nazarul; Corbin, Deborah; Hu, Chuan (2010): Fusogenic pairings of vesicle-associated membrane proteins (VAMPs) and plasma membrane t-SNAREs--VAMP5 as the exception. In: *PLoS one* 5 (12), e14238. DOI: 10.1371/journal.pone.0014238.

Hauck, Stefanie M.; Schoeffmann, Stephanie; Amann, Barbara; Stangassinger, Manfred; Gerhards, Hartmut; Ueffing, Marius; Deeg, Cornelia A. (2007): Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. In: *Journal of proteome research* 6 (6), S. 2121–2131. DOI: 10.1021/pr060668y.

Hauck, Stefanie M.; Suppmann, Sabine; Ueffing, Marius (2003): Proteomic profiling of primary retinal Müller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. In: *Glia* 44 (3), S. 251–263. DOI: 10.1002/glia.10292.

Hauser, Alexandra (2014): Charakterisierung der Expression von vesikel-assoziierten Membranproteinen in Müllerzellen der gesunden und postischämischen Netzhaut. Bachelorarbeit. Universität Regensburg, Regensburg. Institut für Humangenetik.

Haverkamp, Silke; Wässle, Heinz (2004): Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3. In: *The Journal of comparative neurology* 468 (2), S. 251–263. DOI: 10.1002/cne.10962.

Hessvik, Nina Pettersen; Llorente, Alicia (2018): Current knowledge on exosome biogenesis and release. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, S. 193–208. DOI: 10.1007/s00018-017-2595-9.

Higgs, M. H.; Lukasiewicz, P. D. (1999): Glutamate uptake limits synaptic excitation of retinal ganglion cells. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (10), S. 3691–3700.

Hira, Kenichiro; Ueno, Yuji; Tanaka, Ryota; Miyamoto, Nobukazu; Yamashiro, Kazuo; Inaba, Toshiki et al. (2018): Astrocyte-Derived Exosomes Treated With a Semaphorin 3A Inhibitor Enhance Stroke Recovery via Prostaglandin D2 Synthase. In: *Stroke* 49 (10), S. 2483–2494. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.021272.

Hirrlinger, Petra G.; Ulbricht, Elke; Iandiev, Ianors; Reichenbach, Andreas; Pannicke, Thomas (2010): Alterations in protein expression and membrane properties during Müller cell gliosis in a murine model of transient retinal ischemia. In: *Neuroscience letters* 472 (1), S. 73–78. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.01.062.

Hong, Wanjin (2005): SNAREs and traffic. In: *Biochimica et biophysica acta* 1744 (2), S. 120–144. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2005.03.014.

Hough, K. P.; Chanda, D.; Duncan, S. R.; Thannickal, V. J.; Deshane, J. S. (2017): Exosomes in immunoregulation of chronic lung diseases. In: *Allergy*, S. 534–544. DOI: 10.1111/all.13086.

Hoz, Rosa de; Ramírez, Ana I.; González-Martín, Rosa; Ajoy, Daniel; Rojas, Blanca; Salobrar-García, Elena et al. (2018): Bilateral early activation of retinal microglial cells in a mouse model of unilateral laser-induced experimental ocular hypertension. In: *Experimental eye research* 171, S. 12–29. DOI: 10.1016/j.exer.2018.03.006.

Huang, Shan; Ge, Xintong; Yu, Jinwen; Han, Zhaoli; Yin, Zhenyu; Li, Ying et al. (2018): Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, S. 512–528. DOI: 10.1096/fj.201700673R.

Humeau, Yann; Doussau, Frédéric; Grant, Nancy J.; Poulain, Bernard (2000): How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release**This paper is dedicated to the memory of Heiner Niemann. In: *Biochimie* 82 (5), S. 427–446. DOI: 10.1016/s0300-9084(00)00216-9.

Humphrey, M. F.; Moore, S. R. (1995): Strain differences in the distribution of NDP-ase labelled microglia in the normal rabbit retina. In: *Glia* 15 (4), S. 367–376. DOI: 10.1002/glia.440150402.

Ikezawa, Maiko; Tajika, Yuki; Ueno, Hitoshi; Murakami, Tohru; Inoue, Naokazu; Yorifuji, Hiroshi (2018): Loss of VAMP5 in mice results in duplication of the ureter and insufficient expansion of the lung. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 247 (5), S. 754–762. DOI: 10.1002/dvdy.24618.

Inoue, Ran; Hashimoto, Kenji; Harai, Tomomi; Mori, Hisashi (2008): NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (53), S. 14486–14491. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5034-08.2008.

Isenmann, S.; Khew-Goodall, Y.; Gamble, J.; Vadas, M.; Wattenberg, B. W. (1998): A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal. In: *Molecular biology of the cell* 9 (7), S. 1649–1660. DOI: 10.1091/mbc.9.7.1649.

Izumi, Y.; Kirby, C. O.; Benz, A. M.; Olney, J. W.; Zorumski, C. F. (1999): Müller cell swelling, glutamate uptake, and excitotoxic neurodegeneration in the isolated rat retina. In: *Glia* 25 (4), S. 379–389.

Jahn, Reinhart; Scheller, Richard H. (2006): SNAREs--engines for membrane fusion. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (9), S. 631–643. DOI: 10.1038/nrm2002.

Jakobiec, Frederick A.; Brodie, Scott E.; Haik, Barrett; Iwamoto, Takeo (1983): Giant Cell Astrocytoma of the Retina. In: *Ophthalmology* 90 (12), S. 1565–1576. DOI: 10.1016/s0161-6420(83)34348-7.

Jansohn, Monika; Rothhämel, Sophie (2012): Gentechnische Methoden. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Jiang, Pei; Zhang, Shasha; Cheng, Cheng; Gao, Song; Tang, Mingliang; Lu, Ling et al. (2020): The Roles of Exosomes in Visual and Auditory Systems. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, S. 525. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00525.

Johnson, Juliette; Tian, Ning; Caywood, Matthew S.; Reimer, Richard J.; Edwards, Robert H.; Copenhagen, David R. (2003): Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina. GABA and glycine precede glutamate. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (2), S. 518–529.

Jourdain, Pascal; Bergersen, Linda H.; Bhaukaurally, Khaleel; Bezzi, Paola; Santello, Mirko; Domercq, Maria et al. (2007): Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. In: *Nature neuroscience* 10 (3), S. 331–339. DOI: 10.1038/nn1849.

Joyce, Doireann P.; Kerin, Michael J.; Dwyer, Róisín M. (2016): Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. In: *International journal of cancer* 139 (7), S. 1443–1448. DOI: 10.1002/ijc.30179.

Kalra, Hina; Simpson, Richard J.; Ji, Hong; Aikawa, Elena; Altevogt, Peter; Askenase, Philip et al. (2012): Vesiclepedia. A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. In: *PLoS biology* 10 (12), e1001450. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001450.

Kang, Gum-Yong; Bang, Joo Young; Choi, Ae Jin; Yoon, Jeehyun; Lee, Won-Chul; Choi, Soyoung et al. (2014): Exosomal proteins in the aqueous humor as novel biomarkers in patients with neovascular age-related macular degeneration. In: *Journal of proteome research* 13 (2), S. 581–595. DOI: 10.1021/pr400751k.

Karlstetter, Marcus; Scholz, Rebecca; Rutar, Matt; Wong, Wai T.; Provis, Jan M.; Langmann, Thomas (2015): Retinal microglia. Just bystander or target for therapy? In: *Progress in retinal and eye research* 45, S. 30–57. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.11.004.

Keerthikumar, Shivakumar; Chisanga, David; Ariyaratne, Dinuka; Al Saffar, Haidar; Anand, Sushma; Zhao, Kening et al. (2016): ExoCarta. A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. In: *Journal of molecular biology* 428 (4), S. 688–692. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.09.019.

Kettenmann, H.; Verkhratsky, A. (2011): Neuroglia, der lebende Nervenkitt. In: *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 79 (10), S. 588–597. DOI: 10.1055/s-0031-1281704.

Klingeborn, Mikael; Dismuke, W. Michael; Bowes Rickman, Catherine; Stamer, W. Daniel (2017): Roles of exosomes in the normal and diseased eye. In: *Progress in retinal and eye research* 59, S. 158–177. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.04.004.

Kofuji, Paulo; Araque, Alfonso (2020): G-Protein-Coupled Receptors in Astrocyte-Neuron Communication. In: *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.025.

Kuhrt, Heidrun; Wurm, Antje; Karl, Anett; Iandiev, Ianors; Wiedemann, Peter; Reichenbach, Andreas et al. (2008): Müller cell gliosis in retinal organ culture mimics gliotic alterations after ischemia in vivo. In: *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26 (7), S. 745–751. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2008.07.003.

Lande, Kashmiri; Gupta, Jitesh; Ranjan, Ravi; Kiran, Manjari; Torres Solis, Luis Fernando; Solís Herrera, Arturo et al. (2020): Exosomes. Insights from Retinoblastoma and Other Eye Cancers. In: *IJMS* 21 (19). DOI: 10.3390/ijms21197055.

Lawrence, Jean M.; Singhal, Shweta; Bhatia, Bhairavi; Keegan, David J.; Reh, Thomas A.; Luthert, Philip J. et al. (2007): MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (8), S. 2033–2043. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0724.

Lawson, Charlotte; Vicencio, Jose M.; Yellon, Derek M.; Davidson, Sean M. (2016): Microvesicles and exosomes. New players in metabolic and cardiovascular disease. In: *The Journal of endocrinology* 228 (2), R57-71. DOI: 10.1530/JOE-15-0201.

Leinco Technologies, Inc. (2019): Immunoprecipitation Protocol. Online verfügbar unter <https://www.leinco.com/immunoprecipitation/>, zuletzt aktualisiert 2019, zuletzt geprüft am 10.03.2021.

Lenin, Raji; Thomas, Samuel M.; Gangaraju, Rajashekhar (2018): Endothelial Activation and Oxidative Stress in Neurovascular Defects of the Retina. In: *Current pharmaceutical design* 24 (40), S. 4742–4754. DOI: 10.2174/1381612825666190115122622.

- Lenk, Kerstin; Satuvuori, Eero; Lalloquette, Jules; Ladrón-de-Guevara, Antonio; Berry, Hugues; Hyttinen, Jari A. K. (2019): A Computational Model of Interactions Between Neuronal and Astrocytic Networks. The Role of Astrocytes in the Stability of the Neuronal Firing Rate. In: *Frontiers in computational neuroscience* 13, S. 92. DOI: 10.3389/fncom.2019.00092.
- Li, Fenge; Jiang, Danye; Samuel, Melanie A. (2019a): Microglia in the developing retina. In: *Neural development* 14 (1), S. 12. DOI: 10.1186/s13064-019-0137-x.
- Li, He; Luo, Yin; Zhu, Luojiang; Hua, Weilong; Zhang, Yongxin; Zhang, Hongjian et al. (2019b): Glia-derived exosomes. Promising therapeutic targets. In: *Life sciences* 239, S. 116951. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116951.
- Li, Na; Zhao, Lu; Wei, Yankai; Ea, Vicki L.; Nian, Hong; Wei, Ruihua (2019c): Recent advances of exosomes in immune-mediated eye diseases. In: *Stem cell research & therapy* 10 (1), S. 278. DOI: 10.1186/s13287-019-1372-0.
- Li, Su-Fang; Han, Ying; Wang, Feng; Su, Ying (2020): Progress in exosomes and their potential use in ocular diseases. In: *International journal of ophthalmology* 13 (9), S. 1493–1498. DOI: 10.18240/ijo.2020.09.23.
- Li, Weihua; Li, Chuanyun; Zhou, Tong; Liu, Xiuhong; Liu, Xiaoni; Li, Xiupei; Chen, Dexi (2017): Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. In: *Molecular cancer* 16 (1), S. 145. DOI: 10.1186/s12943-017-0706-8.
- Lim, So-Hee; Park, Eunha; You, Boram; Jung, Youngseob; Park, A-Reum; Park, Sung Goo; Lee, Jae-Ran (2013): Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. In: *PloS one* 8 (11), e81218. DOI: 10.1371/journal.pone.0081218.
- Limb, G. Astrid; Salt, Thomas E.; Munro, Peter M. G.; Moss, Stephen E.; Khaw, Peng T. (2002): In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1). In: *Investigative ophthalmology & visual science* 43 (3), S. 864–869.
- Linnertz, R.; Wurm, A.; Pannicke, T.; Krügel, K.; Hollborn, M.; Härtig, W. et al. (2011): Activation of voltage-gated Na^+ and Ca^{2+} channels is required for glutamate release from retinal glial cells implicated in cell volume regulation. In: *Neuroscience* 188, S. 23–34. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.058.
- Liu, Jia; Jiang, Feng; Jiang, Yu; Wang, Yicheng; Li, Zelin; Shi, Xuefeng et al. (2020): Roles of Exosomes in Ocular Diseases. In: *International journal of nanomedicine*, S. 10519–10538. DOI: 10.2147/IJN.S277190.
- Liu, Jia-Jia (2017): Regulation of dynein-dynactin-driven vesicular transport. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 18 (6), S. 336–347. DOI: 10.1111/tra.12475.
- Liu, Tao; Sun, Lei; Xiong, Yingfei; Shang, Shujiang; Guo, Ning; Teng, Sasa et al. (2011a): Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (29), S. 10593–10601. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6401-10.2011.
- Liu, Yun; Sugiura, Yoshie; Lin, Weichun (2011b): The role of synaptobrevin1/VAMP1 in Ca^{2+} -triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. In: *The Journal of physiology* 589 (Pt 7), S. 1603–1618. DOI: 10.1111/jphysiol.2010.201939.
- Lu, Jian; Wu, Jing; Tian, Jie; Wang, Shengjun (2018): Role of T cell-derived exosomes in immunoregulation. In: *Immunologic research* 66 (3), S. 313–322. DOI: 10.1007/s12026-018-9000-0.

Lüllmann-Rauch, Renate (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2019): Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme.

Luo, Cheng; Yang, Xiangjun; Kain, Angela D.; Powell, David W.; Kuehn, Markus H.; Tezel, Gülgün (2010): Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial Toll-like receptor signaling. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (11), S. 5697–5707. DOI: 10.1167/iovs.10-5407.

Luttmann, Werner; Bratke, Kai; Küpper, Michael; Myrtek, Daniel (2014): Der Experimentator. Immunologie. 4., vollst. überarb. u. korrigierte Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum (Experimentator). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>.

Ma, Mingming; Li, Bing; Zhang, Mingliang; Zhou, Lei; Yang, Fuhua; Ma, Feifei et al. (2020): Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on retinal detachment. In: *Experimental eye research* 191, S. 107899. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107899.

Macosko, Evan Z.; Basu, Anindita; Satija, Rahul; Nemesh, James; Shekhar, Karthik; Goldman, Melissa et al. (2015): Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. In: *Cell* 161 (5), S. 1202–1214. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.002.

Mages, Kristin; Grassmann, Felix; Jägle, Herbert; Rupprecht, Rainer; Weber, Bernhard H. F.; Hauck, Stefanie M.; Grosche, Antje (2019): The agonistic TSPO ligand XBD173 attenuates the glial response thereby protecting inner retinal neurons in a murine model of retinal ischemia. In: *Journal of neuroinflammation* 16 (1), S. 43. DOI: 10.1186/s12974-019-1424-5.

Marchaland, Julie; Calì, Corrado; Voglmaier, Susan M.; Li, Haiyan; Regazzi, Romano; Edwards, Robert H.; Bezzi, Paola (2008): Fast subplasma membrane Ca²⁺ transients control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (37), S. 9122–9132. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0040-08.2008.

Martineau, Magalie (2013): Gliotransmission. Focus on exocytotic release of L-glutamate and D-serine from astrocytes. In: *Biochemical Society transactions* 41 (6), S. 1557–1561. DOI: 10.1042/BST20130195.

Matsui Ko, Hosoi Nobutake, Tachibana Masao (1999): Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* (19), S. 6755–6766.

Mbagwu, Smart Ikechukwu; Filgueira, Luis (2020): Differential Expression of CD31 and Von Willebrand Factor on Endothelial Cells in Different Regions of the Human Brain. Potential Implications for Cerebral Malaria Pathogenesis. In: *Brain sciences* 10 (1). DOI: 10.3390/brainsci10010031.

Mead, Ben; Tomarev, Stanislav (2020): Extracellular vesicle therapy for retinal diseases. In: *Progress in retinal and eye research* 79, S. 100849. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100849.

Metea, Monica R.; Newman, Eric A. (2006): Glial cells dilate and constrict blood vessels. A mechanism of neurovascular coupling. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (11), S. 2862–2870. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4048-05.2006.

- Michalski, D.; Härtig, W.; Krügel, K.; Edwards, R. H.; Böddener, M.; Böhme, L. et al. (2013): Region-specific expression of vesicular glutamate and GABA transporters under various ischaemic conditions in mouse forebrain and retina. In: *Neuroscience* 231, S. 328–344. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.046.
- Mignot, G.; Roux, S.; Thery, Clotilde; Ségura, Elodie; Zitvogel, L. (2006): Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 10 (2), S. 376–388. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00406.x.
- Miltenyi Biotec (2017): MACS® Cell Separation. Online verfügbar unter https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf, zuletzt geprüft am 10.03.2021.
- Mitchell, P.; Petfalski, E.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Tollervey, D. (1997): The exosome. A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'--5' exoribonucleases. In: *Cell* 91 (4), S. 457–466.
- Molino, Diana; Nola, Sébastien; Lam, Sin Man; Verraes, Agathe; Proux-Gillardeaux, Véronique; Boncompain, Gaëlle et al. (2015): Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein in membrane domains transport and homeostasis. In: *Cellular logistics* 5 (1), e1025182. DOI: 10.1080/21592799.2015.1025182.
- Montana, Vedrana; Malarkey, Erik B.; Verderio, Claudia; Matteoli, Michela; Parpura, Vladimir (2006): Vesicular transmitter release from astrocytes. In: *Glia* 54 (7), S. 700–715. DOI: 10.1002/glia.20367.
- Montana, Vedrana; Ni, Yingchun; Sunjara, Vice; Hua, Xue; Parpura, Vladimir (2004): Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (11), S. 2633–2642. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3770-03.2004.
- Nager, Andrew R.; Goldstein, Jaclyn S.; Herranz-Pérez, Vicente; Portran, Didier; Ye, Fan; Garcia-Verdugo, Jose Manuel; Nachury, Maxence V. (2017): An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. In: *Cell*, 252-263.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.036.
- Nanjappa, Vishalakshi; Thomas, Joji Kurian; Marimuthu, Arivusudar; Muthusamy, Babylakshmi; Radhakrishnan, Aneesha; Sharma, Rakesh et al. (2014): Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research. 2014 update. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D959–65. DOI: 10.1093/nar/gkt1251.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI): Predicted gene 5414. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406223#gene-expression>, zuletzt geprüft am 10.03.2021.
- Navarrete, Marta; Perea, Gertrudis; Maglio, Laura; Pastor, Jesús; García de Sola, Rafael; Araque, Alfonso (2013): Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 23 (5), S. 1240–1246. DOI: 10.1093/cercor/bhs122.
- Nedergaard, Maiken; Verkhratsky, Alexei (2012): Artifact versus reality--how astrocytes contribute to synaptic events. In: *Glia* 60 (7), S. 1013–1023. DOI: 10.1002/glia.22288.
- Neufeld, A. H. (1999): Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 117 (8), S. 1050–1056. DOI: 10.1001/archopht.117.8.1050.

- Newman, E. A.; Zahs, K. R. (1998): Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (11), S. 4022–4028.
- Newman, Eric A. (2003): Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (5), S. 1659–1666.
- Newman, Eric A. (2004): Glial modulation of synaptic transmission in the retina. In: *Glia* 47 (3), S. 268–274. DOI: 10.1002/glia.20030.
- Ni, Yingchun; Parpura, Vladimir (2009): Dual regulation of Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocytes. Vesicular glutamate transporters and cytosolic glutamate levels. In: *Glia* 57 (12), S. 1296–1305. DOI: 10.1002/glia.20849.
- Nuzzi, Raffaele; Caselgrandi, Paolo; Vercelli, Alessandro (2020): Effect of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Retinal Injury. A Review of Current Findings. In: *Stem cells international* 2020, S. 8883616. DOI: 10.1155/2020/8883616.
- Ormel, Lasse; Stensrud, Mats Julius; Bergersen, Linda Hildegard; Gundersen, Vidar (2012): VGLUT1 is localized in astrocytic processes in several brain regions. In: *Glia* 60 (2), S. 229–238. DOI: 10.1002/glia.21258.
- Parpura, Vladimir; Verkhratsky, Alexei (2012): Astrocytes revisited. Concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. In: *Croat Med J* 53 (6), S. 518–528. DOI: 10.3325/cmj.2012.53.518.
- Parpura, Vladimir; Zorec, Robert (2010): Gliotransmission. Exocytotic release from astrocytes. In: *Brain research reviews* 63 (1-2), S. 83–92. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.11.008.
- Pascual, María; Ibáñez, Francesc; Guerri, Consuelo (2020): Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation. In: *Neural regeneration research* 15 (5), S. 796–801. DOI: 10.4103/1673-5374.268893.
- Pauly, Diana; Agarwal, Divyansh; Dana, Nicholas; Schäfer, Nicole; Biber, Josef; Wunderlich, Kirsten A. et al. (2019): Cell-Type-Specific Complement Expression in the Healthy and Diseased Retina. In: *Cell reports* 29 (9), 2835–2848.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.10.084.
- Pegtel, D. Michiel; Gould, Stephen J. (2019): Exosomes. In: *Annual review of biochemistry* 88, S. 487–514. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111902.
- Perea, Gertrudis; Araque, Alfonso (2010): GLIA modulates synaptic transmission. In: *Brain research reviews* 63 (1-2), S. 93–102. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.10.005.
- Perea, Gertrudis; Navarrete, Marta; Araque, Alfonso (2009): Tripartite synapses. Astrocytes process and control synaptic information. In: *Trends in neurosciences* 32 (8), S. 421–431. DOI: 10.1016/j.tins.2009.05.001.
- Peterson, Maureen F.; Otoc, Nicole; Sethi, Jasmine K.; Gupta, Archana; Antes, Travis J. (2015): Integrated systems for exosome investigation. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 87, S. 31–45. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.04.015.
- Pfrieger, Frank W. (2010): Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. In: *Brain research reviews* 63 (1-2), S. 39–46. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.11.002.
- Plasma Proteome Database. Hg. v. Institute of Bioinformatics, International Technology Park, Bangalore 560 066, Karnataka, India. Online verfügbar unter <http://plasmaproteomedatabase.org/>, zuletzt geprüft am 10.03.2021.

- Pow, D. V.; Robinson, S. R. (1994): Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. In: *Neuroscience* 60 (2), S. 355–366.
- Pulido, Inés Rojo; Jahn, Reinhard; Gerke, Volker (2011): VAMP3 is associated with endothelial weibel-palade bodies and participates in their Ca(2+)-dependent exocytosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1813 (5), S. 1038–1044. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.007.
- Ragusa, Marco; Barbagallo, Cristina; Statello, Luisa; Caltabiano, Rosario; Russo, Andrea; Puzzo, Lidia et al. (2015): miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients. Pathological and diagnostic implications. In: *Cancer biology & therapy* 16 (9), S. 1387–1396. DOI: 10.1080/15384047.2015.1046021.
- Rashid, Khalid; Akhtar-Schaefer, Isha; Langmann, Thomas (2019): Microglia in Retinal Degeneration. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 1975. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01975.
- Rassow, Joachim (2008): Biochemie. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Rastogi, Simran; Sharma, Vaibhav; Bharti, Prahalad Singh; Rani, Komal; Modi, Gyan P.; Nikolajeff, Fredrik; Kumar, Saroj (2021): The Evolving Landscape of Exosomes in Neurodegenerative Diseases. Exosomes Characteristics and a Promising Role in Early Diagnosis. In: *IJMS* 22 (1), S. 440. DOI: 10.3390/ijms22010440.
- Reddy, A.; Caler, E. V.; Andrews, N. W. (2001): Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. In: *Cell* 106 (2), S. 157–169.
- Reichenbach, Andreas; Bringmann, Andreas (2013): New functions of Müller cells. In: *Glia* 61 (5), S. 651–678. DOI: 10.1002/glia.22477.
- Ren, Qiansheng; Barber, Holly Kalani; Crawford, Garland L.; Karim, Zubair A.; Zhao, Chunxia; Choi, Wangsun et al. (2007): Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. In: *Molecular biology of the cell* 18 (1), S. 24–33. DOI: 10.1091/mbc.e06-09-0785.
- Roche, Sarah L.; Ruiz-Lopez, Ana M.; Moloney, Jennifer N.; Byrne, Ashleigh M.; Cotter, Thomas G. (2018): Microglial-induced Müller cell gliosis is attenuated by progesterone in a mouse model of retinitis pigmentosa. In: *Glia* 66 (2), S. 295–310. DOI: 10.1002/glia.23243.
- Rojas, Blanca; Gallego, Beatriz I.; Ramírez, Ana I.; Salazar, Juan J.; Hoz, Rosa de; Valiente-Soriano, Francisco J. et al. (2014): Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. In: *Journal of neuroinflammation* 11, S. 133. DOI: 10.1186/1742-2094-11-133.
- Rosa-Fernandes, Livia; Rocha, Victória Bombarda; Carregari, Victor Corasolla; Urbani, Andrea; Palmisano, Giuseppe (2017): A Perspective on Extracellular Vesicles Proteomics. In: *Frontiers in chemistry* 5, S. 102. DOI: 10.3389/fchem.2017.00102.
- Rossi, David J.; Brady, James D.; Mohr, Claudia (2007): Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. In: *Nature neuroscience* 10 (11), S. 1377–1386. DOI: 10.1038/nn2004.
- Rossi, Valeria; Picco, Raffaella; Vacca, Marcella; D'Esposito, Maurizio; D'Urso, Michele; Galli, Thierry; Filippini, Francesco (2004): VAMP subfamilies identified by specific R-SNARE motifs. In: *Biology of the cell* 96 (4), S. 251–256. DOI: 10.1016/j.biolcel.2003.12.009.

Ruether, Klaus; Feigenspan, Andreas; Pirngruber, Judith; Leitges, Michael; Baehr, Wolfgang; Strauss, Olaf (2010): PKC $\{\alpha\}$ is essential for the proper activation and termination of rod bipolar cell response. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (11), S. 6051–6058. DOI: 10.1167/iovs.09-4704.

Sato, Mahito; Yoshimura, Shinichiro; Hirai, Rika; Goto, Ayako; Kunii, Masataka; Atik, Nur et al. (2011): The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 12 (10), S. 1383–1393. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01247.x.

Sauderson, Sarah C.; Schuberth, Petra C.; Dunn, Amy C.; Miller, Lilija; Hock, Barry D.; MacKay, Philippa A. et al. (2008): Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (12), S. 8146–8152. DOI: 10.4049/jimmunol.180.12.8146.

Savina, Ariel; Furlán, Marcelo; Vidal, Michel; Colombo, Maria I. (2003): Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (22), S. 20083–20090. DOI: 10.1074/jbc.M301642200.

Savina, Ariel; Vidal, Michel; Colombo, Maria I. (2002): The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 12), S. 2505–2515.

Savtchouk, Iaroslav; Volterra, Andrea (2018): Gliotransmission. Beyond Black-and-White. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 38 (1), S. 14–25. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017.

Schiavo, G.; Benfenati, F.; Poulain, B.; Rossetto, O.; Polverino de Laureto, P.; DasGupta, B. R.; Montecucco, C. (1992): Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. In: *Nature* 359 (6398), S. 832–835. DOI: 10.1038/359832a0.

Schorey, Jeffrey S.; Bhatnagar, Sanchita (2008): Exosome function. From tumor immunology to pathogen biology. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, S. 871–881. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x.

Schubert, Vanessa; Bouvier, David; Volterra, Andrea (2011): SNARE protein expression in synaptic terminals and astrocytes in the adult hippocampus. A comparative analysis. In: *Glia* 59 (10), S. 1472–1488. DOI: 10.1002/glia.21190.

Selmaj, Igor; Mycko, Marcin P.; Raine, Cedric S.; Selmaj, Krzysztof W. (2017): The role of exosomes in CNS inflammation and their involvement in multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 306, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.002.

Shen, Beiyi; Wu, Ning; Yang, Jr-Ming; Gould, Stephen J. (2011): Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. In: *The Journal of biological chemistry*, S. 14383–14395. DOI: 10.1074/jbc.M110.208660.

Shen, Weiyong; Fruttiger, Marcus; Zhu, Ling; Chung, Sook H.; Barnett, Nigel L.; Kirk, Joshua K. et al. (2012): Conditional Müller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (45), S. 15715–15727. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2841-12.2012.

Silverman, Sean M.; Wong, Wai T. (2018): Microglia in the Retina. Roles in Development, Maturity, and Disease. In: *Annual review of vision science* 4, S. 45–77. DOI: 10.1146/annurev-vision-091517-034425.

- Slezak, Michal; Göritz, Christian; Niemiec, Aurore; Frisén, Jonas; Chambon, Pierre; Metzger, Daniel; Pfrieger, Frank W. (2007): Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells. In: *Glia* 55 (15), S. 1565–1576. DOI: 10.1002/glia.20570.
- Slezak, Michal; Grosche, Antje; Niemiec, Aurore; Tanimoto, Naoyuki; Pannicke, Thomas; Münch, Thomas A. et al. (2012): Relevance of exocytotic glutamate release from retinal glia. In: *Neuron* 74 (3), S. 504–516. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.03.027.
- Stella, Salvatore L.; Li, Stefanie; Sabatini, Andrea; Vila, Alejandro; Brecha, Nicholas C. (2008): Comparison of the ontogeny of the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) with VGLUT1 and VGLUT2 in the rat retina. In: *Brain research* 1215, S. 20–29. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.03.038.
- Stevens, Eric R.; Esguerra, Manuel; Kim, Paul M.; Newman, Eric A.; Snyder, Solomon H.; Zahs, Kathleen R.; Miller, Robert F. (2003): D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (11), S. 6789–6794. DOI: 10.1073/pnas.1237052100.
- Stoorvogel, Willem; Kleijmeer, Monique J.; Geuze, Hans J.; Raposo, Graca (2002): The Biogenesis and Functions of Exosomes. In: *Traffic* 3 (5), S. 321–330. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x.
- STRING Protein-Protein interaction networks: STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) Protein-Protein interaction networks. Hg. v. ELIXIR, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK. Online verfügbar unter <https://string-db.org/>, zuletzt geprüft am 10.03.2021.
- Szklarczyk, Damian; Morris, John H.; Cook, Helen; Kuhn, Michael; Wyder, Stefan; Simonovic, Milan et al. (2017): The STRING database in 2017. Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), D362-D368. DOI: 10.1093/nar/gkw937.
- Takara Bio Inc. (2018): Probe-based qPCR Kits. Product Overview. Online verfügbar unter <https://www.takarabio.com/learning-centers/real-time-pcr/overview/probe-based-qpcr-kits>, zuletzt aktualisiert 2018, zuletzt geprüft am 10.03.2021.
- Toerne, Christine von; Menzler, Jacob; Ly, Alice; Senniger, Nicole; Ueffing, Marius; Hauck, Stefanie M. (2014): Identification of a novel neurotrophic factor from primary retinal Müller cells using stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13 (9), S. 2371–2381. DOI: 10.1074/mcp.M113.033613.
- Tomlinson, Matthew J.; Tomlinson, Sophie; Yang, Xuebin B.; Kirkham, Jennifer (2013): Cell separation. Terminology and practical considerations. In: *Journal of tissue engineering* 4, 2041731412472690. DOI: 10.1177/2041731412472690.
- UniProt Consortium, The (2017): UniProt. The universal protein knowledgebase. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), D158-D169. DOI: 10.1093/nar/gkw1099.
- Upadhyaya, Raghavendra; Zingg, Winston; Shetty, Siddhant; Shetty, Ashok K. (2020): Astrocyte-derived extracellular vesicles. Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.04.017.

- van Niel, Guillaume; Porto-Carreiro, Isabel; Simoes, Sabrina; Raposo, Graça (2006): Exosomes. A common pathway for a specialized function. In: *Journal of biochemistry* 140 (1), S. 13–21. DOI: 10.1093/jb/mvj128.
- Vecino, Elena; Rodriguez, F. David; Ruzafa, Noelia; Pereiro, Xandra; Sharma, Sansar C. (2016): Glia-neuron interactions in the mammalian retina. In: *Progress in retinal and eye research* 51, S. 1–40. DOI: 10.1016/j.preteyes.2015.06.003.
- Venancio, Thiago M.; Aravind, L. (2010): CYSTM, a novel cysteine-rich transmembrane module with a role in stress tolerance across eukaryotes. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (2), S. 149–152. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp647.
- Verderio, Claudia; Cagnoli, Cinzia; Bergami, Matteo; Francolini, Maura; Schenk, Ursula; Colombo, Alessio et al. (2012): TI-VAMP/VAMP7 is the SNARE of secretory lysosomes contributing to ATP secretion from astrocytes. In: *Biology of the cell* 104 (4), S. 213–228. DOI: 10.1111/boc.201100070.
- Verkhratsky, Alexei; Matteoli, Michela; Parpura, Vladimir; Mothet, Jean-Pierre; Zorec, Robert (2016): Astrocytes as secretory cells of the central nervous system. Idiosyncrasies of vesicular secretion. In: *The EMBO journal* 35 (3), S. 239–257. DOI: 10.15252/embj.201592705.
- Vesiclepedia Database: Vesiclepedia - community compendium for extracellular vesicles. Hg. v. Mathivanan Lab, La Trobe Institute for Molecular Science 1 (LIMS1), Department of Biochemistry, L Trobe University, Kingsbury drive, Bundoora, Victoria, Australien. Online verfügbar unter www.microvesicles.org, zuletzt geprüft am 10.03.2021.
- Wagner, Lysann; Pannicke, Thomas; Rupprecht, Vanessa; Frommherz, Ina; Volz, Cornelia; Illes, Peter et al. (2017): Suppression of SNARE-dependent exocytosis in retinal glial cells and its effect on ischemia-induced neurodegeneration. In: *Glia* 65 (7), S. 1059–1071. DOI: 10.1002/glia.23144.
- Wang, Jinping; Niu, Niu; Xu, Suowen; Jin, Zheng Gen (2019): A simple protocol for isolating mouse lung endothelial cells. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 1458. DOI: 10.1038/s41598-018-37130-4.
- Wang, Minhua; Wang, Xu; Zhao, Lian; Ma, Wenxin; Rodriguez, Ignacio R.; Fariss, Robert N.; Wong, Wai T. (2014): Macroglioma-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (10), S. 3793–3806. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3153-13.2014.
- Wang, Tuanlao; Li, Liangcheng; Hong, Wanjin (2017): SNARE proteins in membrane trafficking. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 18 (12), S. 767–775. DOI: 10.1111/tra.12524.
- Wässle, Heinz; Regus-Leidig, Hanna; Haverkamp, Silke (2006): Expression of the vesicular glutamate transporter vGluT2 in a subset of cones of the mouse retina. In: *The Journal of comparative neurology* 496 (4), S. 544–555. DOI: 10.1002/cne.20942.
- Wei, Fei; Li, Zhengmao; Crawford, Ross; Xiao, Yin; Zhou, Yinghong (2019): Immunoregulatory role of exosomes derived from differentiating mesenchymal stromal cells on inflammation and osteogenesis. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, S. 1978–1991. DOI: 10.1002/term.2947.

- Wilhelm, Alexander; Volknandt, Walter; Langer, David; Nolte, Christine; Kettenmann, Helmut; Zimmermann, Herbert (2004): Localization of SNARE proteins and secretory organelle proteins in astrocytes in vitro and in situ. In: *Neuroscience research* 48 (3), S. 249–257. DOI: 10.1016/j.neures.2003.11.002.
- Wubbolts, R.; Fernandez-Borja, M.; Jordens, I.; Reits, E.; Dusseljee, S.; Echeverri, C. et al. (1999): Opposing motor activities of dynein and kinesin determine retention and transport of MHC class II-containing compartments. In: *Journal of cell science* 112 (Pt 6), S. 785–795.
- Wurm, Antje; Erdmann, Ines; Bringmann, Andreas; Reichenbach, Andreas; Pannicke, Thomas (2009): Expression and function of P2Y receptors on Müller cells of the postnatal rat retina. In: *Glia* 57 (15), S. 1680–1690. DOI: 10.1002/glia.20883.
- Yang, Xiao; Scott, Harry A.; Monickaraj, Finny; Xu, Jun; Ardekani, Soroush; Nitta, Carolina F. et al. (2016): Basement membrane stiffening promotes retinal endothelial activation associated with diabetes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (2), S. 601–611. DOI: 10.1096/fj.15-277962.
- Yuan, L.; Neufeld, A. H. (2001): Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. In: *Journal of neuroscience research* 64 (5), S. 523–532. DOI: 10.1002/jnr.1104.
- Zhang, Qi; Pangrsic, Tina; Kreft, Marko; Krzan, Mojca; Li, Nianzhen; Sul, Jai-Yoon et al. (2004): Fusion-related release of glutamate from astrocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (13), S. 12724–12733. DOI: 10.1074/jbc.M312845200.
- Zhang, Wei; Ma, Yingxue; Zhang, Yue; Yang, Jing; He, Guanghui; Chen, Song (2019): Photo-Oxidative Blue-Light Stimulation in Retinal Pigment Epithelium Cells Promotes Exosome Secretion and Increases the Activity of the NLRP3 Inflammasome. In: *Current eye research* 44 (1), S. 67–75. DOI: 10.1080/02713683.2018.1518458.
- Zhu, Qiuyu Martin; Zhu, Qiuyu; Yamakuchi, Munekazu; Lowenstein, Charles J. (2015): SNAP23 Regulates Endothelial Exocytosis of von Willebrand Factor. In: *PloS one* 10 (8), e0118737. DOI: 10.1371/journal.pone.0118737.
- Zorec, Robert; Araque, Alfonso; Carmignoto, Giorgio; Haydon, Philip G.; Verkhratsky, Alexei; Parpura, Vladimir (2012): Astroglial excitability and gliotransmission. An appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. In: *ASN neuro* 4 (2). DOI: 10.1042/AN20110061.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Antje Grosse am Lehrstuhl für Neurophysiologie des Biomedizinischen Zentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München für die langjährige kompetente und sympathische Begleitung. Als verlässliche Betreuerin hat sie mir das Thema überlassen und die Möglichkeit gegeben, diese Dissertation zu verfassen. Sie hat mich in die Thematik eingearbeitet, mich bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit in jeder Hinsicht stets umgehend und freundlich unterstützt, mein wissenschaftliches Denken gefördert und geduldig alle Fragen beantwortet.

Ich danke auch herzlich Herrn Prof. Dr. Herbert Jägle, Leiter des Bereichs Kinder- und Neuroophthalmologie, Orbita- und erbliche Netzhauterkrankungen am Lehrstuhl für Augenheilkunde der Universitätsklinik Regensburg, für die freundliche Übernahme der Rolle des Doktorvaters und ersten Gutachters.

Ebenso möchte ich mich bei Dirkje Felder für die Anleitung im Labor aufrichtig bedanken. Sie hat mich mit Geduld und Einsatz in die vielfältigen Arbeitstechniken eingearbeitet und die ersten Versuche kompetent und fürsorglich begleitet und war mir während der gesamten Zeit der Experimente meiner Arbeit eine treue Begleiterin.

Auch allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für Humangenetik des Universitätsklinikums Regensburg möchte ich meinen Dank aussprechen für die herzliche Aufnahme als Doktorandin, die Hilfsbereitschaft und wissenschaftliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich hierbei Dr. Karolina Plößl, die freundlich jederzeit für Fragen und Anliegen offen war. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber, Direktor des Instituts für Humangenetik der Universitätsklinik Regensburg, für die Bereitstellung einzelner Laborkapazitäten und Ressourcen.

Ich danke Dr. Frank Pfeifer (INSERM, Straßburg) und Dr. Stefanie Hauck (Helmholtz Zentrum, München), welche als verlässliche Kooperationspartner zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Von Herzen danke ich im Besonderen meiner Schwester, meinem Mann und meinen Eltern für die unermüdliche uneingeschränkte Unterstützung in allen Phasen meines Studiums und meiner Doktorarbeit. Sie ermöglichten mir eine unbeschwerete Zeit der Ausbildung und waren eine wichtige mentale Stütze. Danke, dass sie mich motiviert haben, mir ermutigend zur Seite standen und dass ich mir allzeit ihres liebevollen Rückhalts gewiss sein durfte.