

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

Proteomweite Veränderungen in isolierten
Müller Gliazellen und Verifizierung im Netzhautmodell
im Rahmen der Diabetesforschung im Schwein

von Sandra Sagmeister
aus München

München 2020

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

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

*Für Michael,
meine große Liebe*

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATUR.....	3
2.1	Die diabetische Retinopathie.....	3
2.1.1	Beschreibung und globale Bedeutung	3
2.1.2	Pathogenese, Diagnose und therapeutische Limitationen	4
2.2	Tiermodelle in der Forschung zur diabetischen Retinopathie	6
2.2.1	Bedeutung und Limitationen von Nagermodellen	6
2.2.2	Das Schwein als ein vielversprechendes Modell	8
2.3	Netzhautkulturen in der Forschung zur diabetischen Retinopathie	9
2.3.1	Begriffserklärung.....	9
2.3.2	Zunehmende Bedeutung von Schweinenetzhautkulturen.....	10
2.3.3	Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten	10
2.3.4	Einschränkungen bei der Kultivierung der Netzhaut	12
2.4	Die Rolle von Müller Gliazellen in der Netzhaut.....	13
2.4.1	Physiologische Aufgaben weit über die Stützfunktion hinaus	13
2.4.2	Beteiligung bei pathophysiologischen Prozessen der diabetischen Retinopathie.....	15
2.5	Die Rolle von Glukose in der Netzhaut.....	18
2.5.1	Als der wichtigste Energielieferant	18
2.5.2	Als Auslöser bei der diabetischen Retinopathie	20
2.6	Differenzielle Proteomanalyse.....	22
2.6.1	Aufklärung molekularer Pathogenesemechanismen	22
2.6.2	Das Prinzip der Massenspektrometrie	22
2.6.3	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie als Goldstandard.....	23

3	MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1	Probenmaterial	25
3.1.1	Primäre Schweine Müller Gliazellen	26
3.1.2	Netzhautkulturen aus Schweinen.....	31
3.1.3	Primäre Pigmentepithelzellen aus Schweinen	37
3.1.4	Frische Netzhaut aus Schweinen.....	39
3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration aus Lysaten.....	40
3.2.1	Puffer und Lösungen.....	40
3.2.2	Durchführung	41
3.3	Massenspektrometrie.....	42
3.3.1	FASP-Verdau.....	42
3.3.2	LC-MS/MS	45
3.4	H&E Färbungen von Schweinenetzhaut.....	51
3.4.1	Lösungen und sonstige Materialien	51
3.4.2	Erstellung von Kryoschnitten.....	52
3.4.3	Durchführung	52
3.4.4	Mikroskopische Auswertung	52
3.5	Immunhistologische Färbungen von Schweinenetzhaut.....	53
3.5.1	Charakterisierung des Schweinenetzhautmodells	53
3.5.2	Verifizierung von SPP1	58
4	ERGEBNISSE.....	59
4.1	Differenzielle Proteomanalyse von RMG unter diabetischen Kulturbedingungen.....	59
4.1.1	Hyperglykämie und Glykolysehemmung veränderten das gesamte RMG-Proteom	59

4.1.2	Hyperglykämie veränderte die Proteinexpression in ECM-assoziierten Prozessen	61
4.1.3	Hyperglykämie führte zur verminderten Expression von ECM-Proteinen.....	63
4.1.4	Glykolysehemmung veränderte die Proteinexpression in denselben ECM-assoziierten Prozessen.....	66
4.1.5	Glykolysehemmung führte zur verminderten Expression von ECM-Proteinen.....	68
4.1.6	Hyperglykämie und Glykolysehemmung verminderten die Expression derselben Proteine	72
4.1.7	Hyperglykämie und Glykolysehemmung verminderten die Expression von SPP1, Kollagen- α -Ketten und Integrin- α -Untereinheiten.....	73
4.2	Aufbau eines Schweinenetzhautmodells	79
4.2.1	Benennung einzelner Bereiche der Neuroretina	80
4.2.2	Erstellung eines Workflows für die Präparation.....	82
4.2.3	Die morphologische Struktur als Beurteilungskriterium.....	89
4.2.4	Serum als limitierender Zusatz im RPMI 1640 Kulturmedium	90
4.2.5	Fixation und Einbettung mitsamt der Kulturmembran	94
4.3	Verifizierung von SPP1 im Schweinenetzhautmodell	101
4.3.1	SPP1 wurde in Müller Gliazellen exprimiert	101
4.3.2	Diabetische Kulturbedingungen führten zur SPP1-Expressionsminderung in Müller Gliazellen	102
4.4	Charakterisierung des Schweinenetzhautmodells über die Zeit in vitro	104
4.4.1	Die morphologische Netzhautschichtung blieb bis mindestens Tag 9 erhalten.....	104
4.4.2	Die Morphologie der Zapfen blieb bis mindestens Tag 6 erhalten	106
4.4.3	Müller Gliazellen exprimierten über 14 Tage anhaltend Glutamin Synthetase.....	109

4.4.4	Müller Gliazellen exprimierten über 14 Tage zunehmend Glial Fibrillary Acid Protein	111
4.4.5	Axonbündel der Nervenfaserschicht blieben bis Tag 14 erhalten	115
4.4.6	Das Netzhautproteom änderte sich kaum nach drei Tagen in Kultur..	117
5	DISKUSSION	119
6	ZUSAMMENFASSUNG	147
7	SUMMARY	149
8	LITERATURVERZEICHNIS	151
	DANKSAGUNG	187

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
2-DG	2-Deoxyglukose
3D	Dreidimensional
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
AGC	Automatic Gain Control
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serum Albumin
CALB1	Calbindin
CC-BY	Creative Commons License
CIS	Zapfen-Innensegmente (<i>engl.</i> cone inner segments)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL11A1	Collagen Type 11, alpha 1
COL12A1	Collagen Type 12, alpha 1
COL1A2	Collagen Type 1, alpha 2
COL2A1	Collagen Type 2, alpha 1
COL3A1	Collagen Type 3, alpha 1
COL5A1	Collagen Type 5, alpha 1
COL5A2	Collagen Type 5, alpha 2
COS	Zapfen-Außensegmente (<i>engl.</i> cone outer segments)
CRALBP	Cellular Retinaldehyd Binding Protein
Da	Dalton
DG	Glykolysehemmungs-Gruppe

DIA	Datenunabhängige Erfassungsmethode bei der Massenspektrometrie (<i>engl.</i> data independent acquisition)
DNAse	Desoxyribonuklease
DR	Diabetische Retinopathie
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>engl.</i> extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>engl.</i>	Englisch
<i>ex vivo</i>	<i>lat.</i> außerhalb des Lebendigen
Explantat	Gewebestück, das zur Gewebezüchtung entnommen wird
FASP	Art der Proteinaufbereitung für die Massenspektrometrie (<i>engl.</i> filter-aided sample preparation)
FBS	Fötales Kälberserum
FN1	Fibronectin 1
g	Gramm
GCL	Ganglienzellschicht (<i>engl.</i> ganglion cell layer)
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
GGF	Glial Growth Factor
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1
GS	Glutamin Synthetase
HCD	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>engl.</i> high collision dissociation)
HCL	Salzsäure
hg	Hyperglykämie-Gruppe
HOECHST	Bisbenzimid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> high performance liquid chromatography)
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IgG	Immunglobulin der Klasse G
ILM	Innere Grenzmembran (<i>engl.</i> inner limiting membrane)
<i>in vitro</i>	<i>lat.</i> im Glas, in der Zellkultur
<i>in vivo</i>	<i>lat.</i> im Lebendigen
INL	Innere Kernschicht (<i>engl.</i> inner nuclear layer)

Abkürzungsverzeichnis

IPL	Innere plexiforme Schicht (<i>engl.</i> inner plexiform layer)
IRS	Ausrichtung von Netzhautexplantaten auf der Kulturmembran (<i>engl.</i> inner retinal support)
ITGA8	Integrin Subunit Alpha 8
ITGA5	Integrin Subunit Alpha 5
ITGAL	Integrin Subunit Alpha L
kDa	Kilodalton
l	Liter
lat.	Lateinisch
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
log ₁₀	Dekadischer Logarithmus
log ₂	Binärer Logarithmus
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS1	Massenspektrum der Vorläufer-Peptidionen
MS2	Massenspektrum der Peptidfragmentionen
Na ₂ H ₂ PO ₄ H ₂ O	Natriumhydrogenphosphatmonohydrat
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	Disodiumposphatedihydrate
NaCl	Natriumchlorid
NEFH	Neurofilament 200 (<i>engl.</i> Neurofilament Heavy Protein)
NFL	Nervenfaserschicht (<i>engl.</i> nerve fiber layer)
ng	Kontrollgruppe
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NP40	Nonyl-phenoxypolyethoxylethanol

Nr.	Nummer
OCT	Optimal Cryo Temperature
OLM	Äußere Grenzmembran (<i>engl.</i> outer limiting membrane)
ONL	Äußere Kernschicht (<i>engl.</i> outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (<i>engl.</i> outer plexiform layer)
p	Signifikanzwert (<i>engl.</i> probability-value)
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
POS	Photorezeptor-Außensegmente (<i>engl.</i> photoreceptor outer segments)
PS	Penicillin-Streptomycin
Ratio	Verhältnis zweier Werte
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>engl.</i> relative centrifugal force)
RCVRN	Recoverin
RGC	Ganglienzellen (<i>engl.</i> retinal ganglion cells)
RHO	Rhodopsin
RMG	Müller Gliazellen (<i>engl.</i> retinal Müller glial cells)
ROS	Instabile Sauerstoffradikale (<i>engl.</i> reactive oxygen species)
RPE	Pigmentepithel, Pigmentepithelzellen (<i>engl.</i> retinal pigment epithelium)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SLC1A2	Glial High Affinity Glutamate Transporter
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1
STD	Standard-Ausrichtung von Netzhautexplantaten auf der Kulturmembran
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
STX1A	Syntaxin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> tris buffered saline)
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase

Abkürzungsverzeichnis

TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Hydroxymethylaminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
UA	Urea A-Puffer
VAMP	Synaptobrevin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIM	Vimentin

1 EINLEITUNG

Diabetes mellitus ist ein weltweites Gesundheitsproblem (IDF Diabetes Atlas 9th Edition 2019). In den kommenden 20 Jahren soll die Zahl der Diabetiker global auf insgesamt 700 Millionen Menschen anwachsen (IDF Diabetes Atlas 9th Edition 2019). Etwa ein Drittel aller Diabetiker entwickelt eine diabetische Retinopathie (DR), (Yau et al. 2012). Diese Komplikation ist der Hauptgrund für eine Erblindung im Erwachsenenalter (Nentwich and Ulbig 2015).

Die genauen molekularen Mechanismen bei der Entstehung der DR sind bisher unverstanden (Mesquida, Drawnel, and Fauser 2019). Für die Erforschung der Pathophysiologie eignen sich Schweineaugen, da sich Schweine- und Menschaugen in ihrer Anatomie und im Feinbau der Netzhaut ähnlich sind (Kleinwort et al. 2017; Menduni et al. 2018). Zudem existiert mit dem INS^{C94Y}-Schwein erstmals ein transgenes Diabetesmodell, welches die pathophysiologischen Merkmale der DR des Menschen umfassend repräsentiert (Kleinwort et al. 2017). Dazu gehören auch die funktionellen Veränderungen von Müller Gliazellen (RMG), (Kleinwort et al. 2017). In der Pathophysiologie der DR scheinen veränderte RMG eine wichtige Rolle zu spielen (Coughlin, Feenstra, and Mohr 2017). Ein Hauptaugenmerk dieses Projekts lag deshalb auf der Aufklärung von möglichen Pathogenese-assoziierten Mechanismen, die in der diabetischen Schweinenetzhaut von RMG initiiert werden. Dies erfolgte auf molekularer Ebene durch eine differenzielle Proteomanalyse von isolierten Schweine RMG unter einer diabetischen Stoffwechselsituation.

Um pathophysiologische Zusammenhänge auf Ebene der intakten Netzhaut besser verstehen und von der Einzelzellebene abgeleitete Hypothesen überprüfen zu können, bestand ein weiteres Ziel unseres Projekts im Aufbau eines *ex vivo* Netzhautmodells aus Schweineaugen. Netzhautkulturen bilden die Netzhaut nahe an der *in vivo* Situation ab (Schnichels et al. 2019). Für zielführende Untersuchungen in diesem Modell war es wesentlich, reproduzierbare und qualitativ hochwertige Netzhautkulturen bereitzustellen.

Durch die Verwendung von Schlachtschweineaugen leistete dieses Projekt einen Beitrag zur Entwicklung von Ersatzmethoden für Tierversuche.

2 LITERATUR

2.1 Die diabetische Retinopathie

2.1.1 Beschreibung und globale Bedeutung

Die diabetische Retinopathie (DR) ist eine schwerwiegende Erkrankung der Netzhaut (Nentwich and Ulbig 2015). Sie wird durch Diabetes mellitus ausgelöst (Nentwich and Ulbig 2015). Zu den Risikofaktoren, als Diabetiker an einer DR zu erkranken, zählen die Dauer der Grunderkrankung, schlecht eingestellte Blutzuckerwerte und Bluthochdruck (Magliah et al. 2018). Dadurch kann es zu Veränderungen an den retinalen Blutgefäßen kommen, die zur Schädigung der Netzhautfunktion führen (Magliah et al. 2018). Die Netzhaut ist neben den Gefäßveränderungen auch für neurodegenerative und neuroinflammatorische Prozesse anfällig (Kadłubowska et al. 2016). Im Anfangsstadium verläuft die DR häufig symptomlos, Patienten bemerken die Krankheit erst, wenn ihre Sehkraft beeinträchtigt ist (Tien Y. Wong et al. 2018). Die klinischen Auswirkungen reichen neben einer Sehschärfenminderung über ein schmerzhaftes Glaukom bis hin zu einer vollständigen Erblindung (H. Lee et al. 2019; Horwitz et al. 2016).

Diabetes mellitus wird als eine Epidemie des 21. Jahrhunderts bezeichnet (Kharroubi and Darwish 2015). Nach einem aktuellen Bericht der Internationalen Diabetes Föderation leidet weltweit einer von elf Erwachsenen an Diabetes mellitus (IDF Diabetes Atlas 9th Edition 2019). Die Prävalenz für diese Erkrankung steigt stetig an und wird Schätzungen zufolge im Jahr 2040 bei über 10% der Weltbevölkerung liegen (Ogurtsova et al. 2017). Die DR ist die häufigste Komplikation von Diabetes mellitus und der häufigste Grund für eine Erblindung im Erwachsenenalter (Nentwich and Ulbig 2015). Etwa ein Drittel aller Diabetiker entwickelt eine DR (Yau et al. 2012). Weltweit leiden aktuell rund 3,2 Millionen Menschen unter einer DR in einem fortgeschrittenen Stadium (Flaxman et al. 2017). Mit dem Anstieg der Prävalenz von Diabetes mellitus werden auch die Begleiterkrankungen, wie die DR, zunehmen (R. Lee, Wong, and Sabanayagam 2015).

2.1.2 Pathogenese, Diagnose und therapeutische Limitationen

Lange Zeit wurde die DR als rein mikrovaskuläre Erkrankung verstanden (Kohner et al. 1999; Tien Yin Wong et al. 2002; Nguyen et al. 2008). Mittlerweile weiß man, dass neurodegenerative Prozesse schon sehr früh, bereits vor den ersten strukturellen Veränderungen des Gefäßsystems, auftreten (Lung et al. 2012; van Dijk et al. 2012; Sohn et al. 2016; Frydkjaer-Olsen et al. 2015; Tavares Ferreira et al. 2017; Garcia-Martin et al. 2019). Auch Entzündungsreaktionen und oxidativer Stress spielen im Krankheitsgeschehen eine Rolle (Vujosevic et al. 2016; Brzović-Šarić et al. 2015).

Die Komplikationen Neurodegeneration, Mikrovaskulopathie sowie insbesondere das diabetische Makulaödem sind die Hauptursachen für eine Erblindung im Verlauf der DR (Nentwich and Ulbig 2015). Die Makula beinhaltet die Region des schärfsten Sehens und ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten besonders anfällig für eine Ödembildung (Daruich et al. 2018). Durch das Ödem kommt es zur Kompression von Nervenzellen, Axonen und Blutgefäßen, was schlussendlich zur Erblindung führen kann (Daruich et al. 2018). Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts sind die genauen molekularen Mechanismen, die zur Entstehung wesentlicher Komplikationen bei der DR beitragen, bis heute unverstanden (Mesquida, Drawnel, and Fauser 2019).

Für eine frühestmögliche Diagnosestellung der DR sollte sich jeder Diabetiker zeitnah nach Bekanntwerden des Diabetes mellitus einer umfassenden ophthalmologischen Untersuchung unterziehen (Tien Y. Wong et al. 2018). Anschließend sollte die Netzhaut regelmäßig kontrolliert werden (Tien Y. Wong et al. 2018). Die Diagnose und das Staging der DR erfolgt durch die Methode der Fundus Fotografie (Goh et al. 2016). Das Auffinden von Mikroaneurysmen ist pathognomonisch und das erste diagnostische Anzeichen einer DR (de Carlo et al. 2015). Für Patienten mit Verdacht auf ein Makulaödem ist die zusätzliche Diagnostik mittels optischer Kohärenztomographie erforderlich (Schmidt-Erfurth et al. 2017). Diese dient der Darstellung der Retina im Querschnitt und so der Detektion von Flüssigkeitsansammlungen (Schmidt-Erfurth et al. 2017). Zudem kann die Dicke der Netzhaut gemessen werden (Schmidt-Erfurth et al. 2017). Da bei einer Neurodegeneration die Netzhautdicke abnimmt, könnten Dickenmessungen zukünftig für die Diagnose von neurodegenerativen Veränderungen noch vor dem Auftreten von Mikroaneurysmen genutzt werden (Costello and Burton 2018).

Anhand der ophthalmologischen Untersuchung wird die DR grob in zwei Stadien unterteilt, die nicht-proliferative und die proliferative DR (Wilkinson et al. 2003). Die nicht-proliferative Form wird in die drei Schweregrade mild, moderat und schwer eingeteilt (Wilkinson et al. 2003). Die proliferative Form ist durch ein geringes bzw. ein hohes Risiko von Gefäßneubildungen am Sehnervenkopf gekennzeichnet (Wilkinson et al. 2003). Alle Stadien der DR können mit dem gefürchteten Makulaödem einhergehen (Heng et al. 2013).

Die im Stadium der nicht-proliferativen DR detektierten Mikroaneurysmen sind zunächst asymptomatisch, können aber rupturieren und zu punktuellen Blutungen führen (de Carlo et al. 2015). Mit zunehmendem Schweregrad der nicht-proliferativen DR treten größere Blutungen sowie weitere mikrovaskuläre Veränderungen, wie Gefäßverengungen und Gefäßanomalien, auf (Corcóstegui et al. 2017). Die Veränderungen am Gefäßsystem begünstigen eine Minderperfusion der Netzhaut (Stefánsson et al. 2018). Diese führt zur Neubildung von Blutgefäßen mit dem Ziel, die Durchblutung wiederherzustellen (Yafeng Li, Yu, and VanderBeek 2019). Damit beginnt die proliferative Verlaufsform der DR (Yafeng Li, Yu, and VanderBeek 2019). Durch die erhöhte Permeabilität der neu gebildeten Blutgefäße kommt es zu Einblutungen in den Glaskörper (Annan and Carvounis 2014). Multiple Faktoren bewirken zudem einen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, was das Risiko für ein Makulaödem erhöht (Gundogan et al. 2016). In der Untersuchung des Augenhintergrunds können Ablagerungen von Lipiden, sogenannte harte Exsudate, festgestellt werden (Raman et al. 2015). Im weiteren Verlauf der proliferativen DR kommt es außerdem zum sogenannten „angio-fibrotic-switch“ (Kuiper et al. 2008). Entlang neu gebildeter Blutgefäße wächst auf der Innenfläche der Retina fibrotisches Gewebe (Roy, Amin, and Roy 2016). Durch eine Schrumpfung dieses Gewebes kann es zur Netzhautablösung kommen (Roy, Amin, and Roy 2016). Wird dabei der Kammerwinkel verlegt, kann sich ein äußerst schmerzhaftes Glaukom entwickeln (Song, Aiello, and Pasquale 2016).

Die Therapie der DR und des diabetischen Makulaödems erfolgt durch die intravitreale Applikation von Entzündungshemmern oder anti-angiogenen Faktoren, teilweise in Kombination mit einer Laserphotokoagulation zum Verschluss undichter Blutgefäße (Distefano et al. 2017). Dadurch ist es möglich, das Risiko einer vollständigen Erblindung zu reduzieren (Marozas and Fort 2014). Eine Verbesserung

des Sehvermögens kann bei vielen Patienten allerdings nicht erzielt werden (Sacconi et al. 2019; Stewart 2016). Zudem sind beide Therapieformen mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden (Nuzzi and Tridico 2015; Deschler, Sun, and Silva 2014). Um Patienten mit einer DR zukünftig besser helfen zu können, ist die Entwicklung innovativer Therapiestrategien notwendig (Mesquida, Drawnel, and Fauser 2019). Das grundlegende Verständnis von molekularen Mechanismen in der Pathogenese der DR kann erheblich zur Entwicklung solcher Therapiestrategien beitragen (Mesquida, Drawnel, and Fauser 2019).

2.2 Tiermodelle in der Forschung zur diabetischen Retinopathie

2.2.1 Bedeutung und Limitationen von Nagernmodellen

Um die Pathogenesemechanismen bei der DR verstehen und untersuchen zu können, sind Tiermodelle von entscheidender Bedeutung (Olivares et al. 2017). Denn Netzhäute von Patienten stehen allenfalls vereinzelt und dann in sehr späten Stadien der DR zur Verfügung, so dass die ursprünglichen Dysregulationen nicht mehr zu erfassen sind.

Zu den Methoden, Diabetes mellitus und damit die Folgeerkrankung DR im Tiermodell hervorzurufen, zählen die chemische Induktion mit Streptozotocin oder Alloxan, die Verfütterung einer zuckerhaltigen Diät sowie die chirurgische Entfernung des Pankreas (Rakieten, Rakieten, and Nadkarni 1963; McLetchie 2002; Renu A. Kowluru, Tang, and Kern 2001; Chaib et al. 2011). Darüber hinaus werden diabetische Tiermodelle zunehmend auch durch genetische Mutationen entwickelt (Olivares et al. 2017). Dies geschieht in Anlehnung an eine genetische Komponente bei der Entstehung von Diabetes mellitus beim Menschen, die auch durch Mutationen im Insulingen gekennzeichnet ist (Weijnen et al. 2002; Pociot and McDermott 2002; M. Liu et al. 2015). Transgene Tiermodelle haben gegenüber den induzierten Modellen den Vorteil, dass sie gut reproduziert werden können (Metz, Hudson, and Pavlov 2016).

Für den translationalen Wert eines Tiermodells für die DR-Forschung ist es entscheidend, dass das Modell strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zur Verlaufsform der DR des Menschen entwickelt und dass es die Pathologie möglichst umfangreich repräsentiert (Kleinwort et al. 2017). Für die Erforschung der DR existierte lange Zeit kein Tiermodell, welches die komplexen mikrovaskulären und

neurodegenerativen Prozesse beim Menschen umfassend abbildete (Olivares et al. 2017). Aufgrund ihrer Eignung als Labortiere wurden vor allem traditionelle Tiermodelle in der Maus und in der Ratte genutzt (Toh et al. 2019; Bapputty et al. 2019). Allerdings sind bei der Diabetesforschung im NagermodeLL generell wichtige Limitationen zu beachten, die unter anderen auf substanzielle Unterschiede hinsichtlich Ernährung und Stoffwechsel gegenüber dem Menschen zurückzuführen sind (Al-Awar et al. 2016). Speziell für die DR-Forschung ist das fehlende Ausbilden einer Neovaskularisation und eines Makulaödems bei diesen Tierarten limitierend (Kern, Antonetti, and Smith 2019). Die unterschiedliche Pathophysiologie liegt bei den klassischen NagermodeLLen nicht zuletzt an den grundlegenden Unterschieden im Aufbau des Auges und in der Struktur der Netzhaut (Slijkerman et al. 2015). So besitzen Mäuse zum Beispiel keinen Bereich der Netzhaut, der hinsichtlich des funktionellen Feinbaus mit der Makula des Menschen zu vergleichen ist (Huber et al. 2010).

Die $INS2^{Akita}$ -Maus ist ein diabetisches Mausmodell, das eine Punktmutation im Insulingen aufweist (Alistair J. Barber et al. 2005). Die Punktmutation im Insulingen führt zu einer Konformationsänderung von Insulin (Alistair J. Barber et al. 2005). Dieses Protein akkumuliert dann in den β -Zellen des Pankreas und führt dort zum Zelltod (Alistair J. Barber et al. 2005). Die Tiere entwickeln daraufhin eine Hypoinsulinämie und Hyperglykämie (Alistair J. Barber et al. 2005). Für dieses Mausmodell wurden zunächst subklinische Veränderungen der Netzhaut beschrieben, die zu einer vorklinischen Phase der DR passen (Alistair J. Barber et al. 2005; Smith et al. 2008). Das waren unter anderen eine Abnahme der Dicke einzelner Netzhautschichten und Schäden am Blutgefäßsystem (Alistair J. Barber et al. 2005; Smith et al. 2008). Eine aktuellere Studie konnte weder eine veränderte Dicke der Netzhautschichten noch pathologische Veränderungen an den Blutgefäßen bei der $INS2^{Akita}$ -Maus bestätigen (McLenachan et al. 2013). Die unterschiedlichen Ergebnisse aus ein und demselben Modell sind wahrscheinlich auf eine erhebliche Variabilität dieses Modells zurückzuführen, was die $INS2^{Akita}$ -Maus wenig zuverlässig für die DR-Forschung macht (Alistair J. Barber 2015).

Darüber hinaus wurde das Mausmodell auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6 generiert (McLenachan et al. 2013). Bei diesem genetischen Hintergrund gibt es die zwei Unterstämme C57BL/6J und C57BL/6N (Schnabolk et al. 2014). Bei Mäusen des Unterstamms C57BL/6N wurde vor einigen Jahren die rd8-Mutation im *crb1*-Gen

festgestellt. Die rd8-Mutation kann für sich alleine schon zur Degeneration der Netzhaut führen (Luhmann et al. 2012; Mattapallil et al. 2012). Für Untersuchungen an der Netzhaut von Mäusen mit diesem genetischen Hintergrund muss deshalb die rd8-Mutation mittels einer Genanalyse ausgeschlossen werden (McLenachan et al. 2013). Da dies bei zahlreichen ophthalmologischen Forschungsstudien nicht erfolgte, sind die Ergebnisse dieser Studien nicht verwertbar (Luhmann et al. 2012; Mattapallil et al. 2012). Aufgrund der speziellen Problematik ist das INS2^{Akita}-Mausmodell nicht für Studien zur DR geeignet (McLenachan et al. 2013).

2.2.2 Das Schwein als ein vielversprechendes Modell

Durch die Limitationen bei den Nagernmodellen rücken zunehmend unkonventionelle Großtierarten, wie das Schwein, in den Fokus der Forschung (Wolf et al. 2014; Kleinwort et al. 2017; Renner et al. 2020). Schweine können aufgrund anatomischer und physiologischer Gemeinsamkeiten mit dem Menschen bestimmte biologische und molekulare Mechanismen besser abbilden (Wolf et al. 2014; Kleinwort et al. 2017). Bei der Diabetesforschung zählen der heterogene genetische Hintergrund und Gemeinsamkeiten mit dem Menschen bei der omnivoren Ernährung sowie bei der Regulation des Blutzuckerspiegels zu den Vorzügen gegenüber Nagernmodellen (Renner et al. 2013; Flisikowska, Kind, and Schnieke 2014). Da Schweine vergleichsweise alt werden, eignen sie sich besonders für Langzeituntersuchungen von chronischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus (Renner et al. 2013).

Betreffend spezifischer Untersuchungen am Auge ist das Schweineauge in Größe und Anatomie vergleichbar mit dem des Menschen, was es für die Entwicklung translationaler Diagnostik- und Therapieformen sehr interessant macht (Sanchez et al. 2011; Menduni et al. 2018; Middleton 2010). Insbesondere die Netzhaut ist im Hinblick auf ihren funktionellen Feinbau der menschlichen Netzhaut sehr ähnlich (Chandler et al. 1999). Die strukturell ähnliche Blutversorgung prädisponiert die Schweineretina besonders für Studien der Mikrovaskulatur (Olsen et al. 2002). Außerdem besitzen Schweine eine Region in der Netzhaut, die der zapfen- und ganglienzellreichen Makula des Menschen entspricht (Hendrickson and Hicks 2002; Chandler et al. 1999; Kleinwort et al. 2017). Die Schweinenetzhaut eignet sich damit hervorragend für die Erforschung von Krankheiten der Makula (Sommer et al. 2011).

Für die Diabetesforschung existiert ein transgenes Schweinmodell (INS^{C94Y}-Schwein), das genetisch der INS2^{Akita}-Maus entspricht (Renner et al. 2013). Im Gegensatz zur INS2^{Akita}-Maus gilt das INS^{C94Y}-Schwein als ein vielversprechendes translationales Modell für die DR des Menschen (Kleinwort et al. 2017). Klinische Symptome am Auge entwickeln sich schon bei Tieren mit wenigen Tagen Lebensalter in Form einer ausgeprägten, diabetischen Katarakt (Renner et al. 2013). Nach zwei Jahren chronischer Hyperglykämie besteht eine Retinopathie mit großer Übereinstimmung zur DR des Menschen (Kleinwort et al. 2017). Dabei zeigen sich insbesondere die visusbedrohenden Komplikationen, wie Veränderungen der Mikrovaskulatur und ein Ödem in der zentralen Region der Schweinenetzhaut, das dem Makulaödem des Menschen ähnlich ist (Kleinwort et al. 2017). Außerdem kommt es zur Auflösung der inneren Grenzmembran an der inneren Oberfläche der Retina, welche in engem Kontakt mit den Endfüßen von Müller Gliazellen (RMG) steht (Kleinwort et al. 2017; Syrbe et al. 2018). Dies deutet auf eine strukturelle Veränderung dieses Zelltyps hin (Kleinwort et al. 2017). Darüber hinaus zeigt sich in den RMG eine veränderte Expression wichtiger funktioneller Proteine wie Aquaporin 4 und Glutamin Synthetase, was den Rückschluss auf funktionelle Veränderungen von RMG in diesem Retinopathiemodell nahe legt (Kleinwort et al. 2017). Diese Ergebnisse machen das Schwein besonders interessant für die Erforschung der spezifischen Rolle von RMG bei der DR.

2.3 Netzhautkulturen in der Forschung zur diabetischen Retinopathie

2.3.1 Begriffserklärung

Neben dem wertvollen Beitrag, den *in vivo* Untersuchungen im Schweinmodell leisten können, werden auch *in vitro* Studien zur Erforschung der DR durchgeführt (Mi et al. 2014). Diese können entscheidend zum Verständnis von pathophysiologischen Mechanismen bei der DR beitragen (Matteucci et al. 2015). *In vitro* Studien können sowohl auf der Basis von Einzelzellkulturmodellen als auch von organotypischen Netzhautkulturen erfolgen (Matteucci et al. 2015).

Bei organotypischen Netzhautkulturen wird ein Teil der Netzhaut als ein intaktes Gewebestück kultiviert (Matteucci et al. 2015). Dabei ist in der Regel die isolierte Neuroretina gemeint, das heißt die Netzhaut ohne das retinale Pigmentepithel (RPE), (Rettinger and Wang 2018; Iván Fernandez-Bueno et al. 2012; J. Winkler et al. 2002;

Taylor et al. 2014). Seltener werden Ko-Kulturen der Neuroretina mit dem RPE beschrieben (Kaempff et al. 2008; Di Lauro et al. 2016; Pinzón-Duarte et al. 2000). *Ex vivo* organotypische Kulturen werden auch als „Explantate“ bezeichnet.

2.3.2 Zunehmende Bedeutung von Schweinenetzhautkulturen

Die Idee, die Neuroretina einer Ratte als ein *in vitro* Modell zu nutzen, gab es bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts (Tansley 1933). In den vergangenen Jahrzehnten haben Netzhautexplantate in der Augenforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen (Schnichels et al. 2019). Insbesondere die Neuroretina von Schweinen hat mittlerweile einen hohen Stellenwert für die Erforschung von Netzhauterkrankungen des Menschen (Zadeh et al. 2019; Elmi et al. 2019; Ruzafa et al. 2017; Acharya et al. 2017). Eine Vielzahl an Studien beschreibt daher die Entwicklung geeigneter Methoden für die Kultivierung von Schweinenetzhaut sowie die Etablierung von Schweinenetzhautmodellen für die translationale Forschung (Di Lauro et al. 2016; Kobuch et al. 2008; Ivan Fernandez-Bueno et al. 2008; Maliha et al. 2019; Rettinger and Wang 2018; Engelsberg and Ghosh 2007; Ghosh, Taylor, and Arnér 2012; Taylor et al. 2017; Jianfeng Wang et al. 2011; Åkerström et al. 2017).

2.3.3 Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten

Netzhautkulturen gelten als eine Zwischenform zwischen Einzelzellkulturen *in vitro* und Tiermodellen *in vivo* (Müller et al. 2017). Dabei bieten sie entscheidende Vorteile gegenüber der Kultivierung isolierter Netzhautzellen, weil sie die Bedingungen näher an der *in vivo* Situation abbilden (Alarautalahti et al. 2019; Rettinger and Wang 2018). Die eng verflochtene Schichtung aus hoch spezialisierten Netzhautzelltypen bleibt erhalten, was eine funktionelle Abbildung von dynamischen Zusammenhängen und interzellulären Wechselbeziehungen *in vitro* ermöglicht (Ying Li et al. 2018; Schnichels et al. 2019).

Einige Fragestellungen in der DR-Forschung können nur unter Berücksichtigung dieser Wechselbeziehungen beantwortet werden (Matteucci et al. 2015). Im komplexen Netzwerk der Retina kommt es zu einer engen Interaktion von Glia- und Nervenzellen (Skytt et al. 2016). Dieses Zusammenspiel bewirkt, dass sich bei der

DR pathologische Veränderungen in RMG negativ auf die Nervenzellfunktion auswirken (Subirada et al. 2018). Da Netzhautexplantate die glia-neuronalen Wechselbeziehungen abbilden, sind sie ein vielversprechendes Modellsystem für die Erforschung von neurodegenerativen Prozessen bei der DR (Valdés et al. 2016). Die Kultur der isolierten Neuroretina ermöglicht dabei die Untersuchung neurodegenerativer Prozesse unabhängig von Effekten des externen Immunsystems (Osborne et al. 2016; Valdés et al. 2016).

Die intakte 3D-Struktur von Netzhautkulturen erlaubt nicht nur den Erhalt zellulärer Interaktionen, sondern auch die Abbildung der retinalen extrazellulären Matrix (ECM), (Al-Ubaidi, Naash, and Conley 2013). Die ECM ist ein Netzwerk aus speziellen ECM-Proteinen, die von Zellen produziert und sekretiert werden (Reinhard, Joachim, and Faissner 2015). Sie hat eine wichtige Funktion in der Netzhaut, indem sie mechanische Unterstützung bietet und die zelluläre Homöostase und Signalübertragung reguliert (Reinhard, Joachim, and Faissner 2015). Pathologische Veränderungen der ECM treten beispielsweise bei der proliferativen Verlaufsform der DR auf, bei der es zur übermäßigen Ablagerung von ECM-Proteinen kommt (Chang, Lajko, and Fawzi 2018). Das Verständnis der pathologischen ECM-Veränderungen kann somit wichtige Aufschlüsse über die proliferative DR geben (George et al. 2009). Bei der Erforschung der ECM *in vitro* gilt es allerdings zu beachten, dass isolierte Zellen ihre ECM-Proteinproduktion an die Kulturbedingung adaptieren, was den Transfer der Ergebnisse in den *in vivo* Organverbund erschwert (Jhala et al. 2019). Organotypische Netzhautkulturen ermöglichen hingegen die Untersuchung der ECM in einer intakten 3D-Struktur.

Neben der Nähe zur *in vivo* Situation bringt die Verwendung von Netzhautexplantaten auch viele Vorteile, die ein Zellkulturmodell hat, mit sich: Experimente können unter genau definierten, reproduzierbaren und gezielt beeinflussbaren Laborbedingungen stattfinden (Müller et al. 2017). So lassen sich beispielsweise spezifische Effekte einzelner, dysregulierter Moleküle des diabetischen Milieus studieren (Matteucci et al. 2015). Zudem sind Experimente an Netzhautkulturen kostengünstiger und auch einfacher durchzuführen als Experimente im Tiermodell, wo die Netzhaut schwer erreichbar ist (Ying Li et al. 2018). Außerdem trägt die Verwendung von Netzhautexplantaten zur Reduktion bzw. zur Vermeidung von Tierversuchen bei (Combes and Shah 2016). Die Netzhaut

eines Auges kann bei der Kultivierung in mehrere Proben geteilt werden, was die Zahl der verwendeten Versuchstiere reduziert (Taylor, Arnér, and Ghosh 2016). Bei der Verwendung von Augen von Schlachttieren können Tierversuche gänzlich vermieden werden (Schnichels et al. 2019).

2.3.4 Einschränkungen bei der Kultivierung der Netzhaut

Trotz aller Vorteile sind auch einige Restriktionen organotypischer Netzhautkulturen zu berücksichtigen. Beispielsweise ist die Zeitspanne, über die Explantate der Neuroretina in Kultur gehalten werden können, begrenzt (Ying Li et al. 2018). Langzeitstudien sind damit nicht möglich (Ying Li et al. 2018). Studien an Netzhautexplantaten aus dem Menschen beschreiben eine Kultivierungsdauer von etwa zwei bis drei Wochen (Murali et al. 2019). Die Zeitdauer, über die die Schweinenetzhaut kultiviert werden kann, ist verhältnismäßig kürzer und liegt bei etwa zehn Tagen (Taylor et al. 2014; Schnichels et al. 2019).

Unabhängig von der Tierart können Explantate aus der immaturen (embryonal, fötal, neonatal, postnatal) Netzhaut länger kultiviert werden als solche aus der adulten Retina (Valdés et al. 2016; Ferrer-Martín et al. 2014; Caffé et al. 2001; Rettinger and Wang 2018; Ying Li et al. 2018). Aufgrund des abweichenden Entwicklungsstadiums haben immature Netzhautkulturen jedoch nur einen limitierten Wert als Modell für die adulte Netzhaut *in vivo* (Rettinger and Wang 2018). Demnach ist die Verwendung voll entwickelter Kulturen für die translationale Forschung an Krankheiten, welche beim Menschen im Erwachsenenalter auftreten, unverzichtbar (Rettinger and Wang 2018). Sicherlich gilt es, je nach Fragestellung, einen Kompromiss aus Kultivierbarkeit und Übertragbarkeit zu finden (Rettinger and Wang 2018).

Zu Bedenken ist außerdem, dass es allein durch die Kultivierung zu Veränderungen in der Netzhaut kommt, welche sich limitierend auf die Übertragbarkeit in die *in vivo* Situation auswirken können (Ying Li et al. 2018). Eine rasch einsetzende Neurodegeneration sowie eine pathologische Aktivierung von Gliazellen sind generelle Effekte in Kultur, unabhängig von der Tierart (Iván Fernandez-Bueno et al. 2012; Johnson and Martin 2008; Osborne et al. 2016; Müller et al. 2017). Dabei werden neurodegenerative Veränderungen zwangsläufig schon durch die Präparation der Netzhaut verursacht (Alarautalahti et al. 2019; Murali et al. 2019). Die unvermeidbare Axotomie des Sehnervs im Zuge der Explantierung ruft in der

kultivierten Neuroretina ähnliche Prozesse hervor, wie sie auch *in vivo* durch Axotomie ausgelöst werden (Fisher et al. 2005; Alarautalahti et al. 2019; Murali et al. 2019). Dies wirkt sich vor allem auf Ganglienzellen aus und die Degeneration und der Verlust dieser Nervenzellen ist schon nach wenigen Tagen in Kultur durch die Abnahme der retinalen Gesamtdicke erkennbar (Bull et al. 2011; Müller et al. 2017; J. Winkler et al. 2002; Nadal-Nicolás et al. 2015).

Besondere Limitationen von isolierten Neuroretinakulturen ergeben sich für pharmakologische Untersuchungen, da Pharmaka *in vitro* direkt in oder auf die Netzhaut verabreicht, *in vivo* aber intravitreal appliziert werden (Peyman, Lad, and Moshfeghi 2009). Werden Substanzen direkt auf die Oberfläche von Netzhautkulturen aus Rindern verabreicht, führt dies im Vergleich zur *in vivo* Situation zu einer zu hoch eingeschätzten Aufnahme dieser Substanzen in die Netzhaut (Peynshaert et al. 2017). Deshalb ist die isolierte Kultur der Netzhaut ohne den aufliegenden Glaskörper für pharmakologische Studien nur eingeschränkt geeignet (Peynshaert et al. 2017). Daher haben Peynshaert et al. ein Rinderaugenmodell entwickelt, bei dem der Glaskörper der Netzhaut noch aufliegt (Peynshaert et al. 2017). Wird in diesem Modell eine Substanz in den Glaskörper appliziert, kann die Aufnahme dieser Substanz nahe an der *in vivo* Situation studiert werden (Peynshaert et al. 2017).

2.4 Die Rolle von Müller Gliazellen in der Netzhaut

2.4.1 Physiologische Aufgaben weit über die Stützfunktion hinaus

Die Retina besteht aus einem komplexen Netzwerk hoch spezialisierter Zellen (Rakieten, Rakieten, and Nadkarni 1963). Die primären Nervenzellen, die Photorezeptoren, wandeln einen visuellen Reiz in ein elektrisches Signal, welches dann von den Interneuronen modifiziert und schlussendlich über die Ganglienzellen und deren Axone im Sehnerv an das Gehirn weitergegeben wird (Joselevitch 2008). RMG sind die wichtigsten Makrogliazellen der Netzhaut und es ist bekannt, dass die physiologische Funktionsfähigkeit der Retina unmittelbar von diesem Zelltyp abhängt (E. Newman and Reichenbach 1996; Reichenbach and Bringmann 2013). Sie fungieren als eine mechanische Stütze der Netzhaut, was auch in ihrer Zuordnung zur Gruppe der Gliazellen (*lat. glia*: Kleber) zum Ausdruck kommt (Y.-B. Lu et al.

2006; Virchow 1856). Um diese Aufgabe zu erfüllen, durchspannen RMG bei unterschiedlichen Tierarten mit ihren radiären Zellfortsätzen vertikal die gesamte Netzhaut (Amann et al. 2016).

Jede RMG ist von einer Gruppe Nervenzellen umgeben und zusammen bilden sie die kleinste funktionelle Einheit der Netzhaut (Reichenbach and Bringmann 2013). Innerhalb dieser Einheit bietet die RMG den assoziierten Nervenzellen metabolische und funktionelle Unterstützung (Reichenbach and Bringmann 2013). In der Säugetiernetzhaut produzieren RMG Laktat und stellen es den Nervenzellen als Nährstoff zur Verfügung (C. L. Poitry-Yamate, Poitry, and Tsacopoulos 1995; Mohammad Shamsul Ola and LaNoue 2019). Zudem ist die Beseitigung von neuronalen Abfallprodukten durch RMG in der Mäusenetzhaut beschrieben (Sakami, Imanishi, and Palczewski 2018). Aus Studien an der Schweine- und Mäusenetzhaut ist außerdem bekannt, dass RMG neurotrophe Faktoren und Antioxidantien produzieren, um diese bei Bedarf an die Nervenzellen zu entlassen (Ruzafa, Pereiro, Aspichueta, et al. 2018; Grosche et al. 2016).

Darüber hinaus sind RMG durch die Regulation der Ionenzusammensetzung und der Flüssigkeitsmenge im Extrazellularraum in der Lage, eine optimale Umgebung für die neuronale Funktion zu schaffen (Reichenbach and Bringmann 2013). Untersuchungen bei Nagetieren haben gezeigt, dass RMG dies durch den gezielten Transport von Kalium gewährleisten (Wurm et al. 2009; Grosche et al. 2013; Hirrlinger et al. 2008; Wahl et al. 2013; Garcia et al. 2014; Berk 2015; Vogler et al. 2016). Kalium wird bedarfsgerecht aus der Netzhaut heraus in extraretinale Kompartimente transportiert, ein Vorgang, der von Newman et al. als „potassium siphoning“ bezeichnet wurde (E. A. Newman, Frambach, and Odette 1984). Für die Kaliumabgabe stehen RMG in der Mäuseretina mit drei externen Kompartimenten der Netzhaut in Kontakt (Jingjing Wang et al. 2017). Das sind die intraretinalen Blutgefäße, der Glaskörper und der subretinale Raum (Jingjing Wang et al. 2017). Für den gezielten Kaliumtransport exprimieren RMG aus verschiedenen Spezies unterschiedliche Kaliumkanäle (Rao et al. 2019; Lin et al. 2018; Zayas-Santiago et al. 2014; Skatchkov et al. 2006). Bei der Aufnahme von Kalium in die RMG bzw. Abgabe aus der RMG entsteht ein osmotisches Gefälle (Reichenbach and Bringmann 2013). Diesem Gefälle folgt extrazelluläre Flüssigkeit durch bestimmte Wasserkanäle in der Zellmembran von RMG passiv nach (Spaide 2016). So kann Flüssigkeit in

Abhängigkeit von Kalium von extrazellulär aufgenommen und an extraretinale Kompartimente abgegeben werden (Spaide 2016). Die Wasserkanäle, auch als Aquaporine bezeichnet, wurden in RMG etlicher Tierarten nachgewiesen (Amann et al. 2016).

Für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion ist auch die Regulation des Neurotransmittergehalts an der Synapse essentiell, die von RMG gewährleistet wird (Lin et al. 2018). Glutamat ist einer der wichtigsten Neurotransmitter in der Retina (Massey 1990). Eine rasche Clearance von Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist von zentraler Bedeutung, da die längerfristige Erregung von Glutamat-Rezeptoren im Mausmodell zum neuronalen Zelltod durch Exzitotoxizität (Reizüberflutung) führt (Christensen et al. 2019). In der Netzhaut von Ratten exprimieren RMG zu diesem Zweck sowohl den Glutamat Transporter GLAST, um Glutamat aufzunehmen, als auch das RMG-spezifische Enzym Glutamine Synthetase, um das aufgenommene Glutamat in Glutamin umzuwandeln (Lin et al. 2018). Die Aufnahme von Glutamat und Umwandlung zu Glutamin in RMG ist der wichtigste Schutzmechanismus in der Netzhaut, welcher eine Neurotoxizität durch Glutamat verhindert (Lin et al. 2018).

2.4.2 Beteiligung bei pathophysiologischen Prozessen der diabetischen Retinopathie

RMG scheinen bei der DR wesentlich an pathologischen Prozessen in der Netzhaut beteiligt zu sein (Coughlin, Feenstra, and Mohr 2017). Aktuell gibt es die Idee, RMG durch eine gezielte Modulation für neue Therapieformen der DR zu nutzen (Ghaseminejad et al. 2019; Yao et al. 2018; McDowell et al. 2018). Im Folgenden soll auf ausgesuchte Aspekte einer RMG-Beteiligung an neurodegenerativen Prozessen sowie an der Entstehung des Makulaödems bei der DR eingegangen werden.

RMG aus Säugetieren reagieren auf jegliche Art von Reiz mit einem Prozess zellulärer und molekularer Veränderungen, der als Aktivierung oder „Gliose“ bezeichnet wird (Graca, Hippert, and Pearson 2018). Dieser Prozess kann in erster Linie als Schutzmechanismus verstanden werden (Graca, Hippert, and Pearson 2018). Ein früher Indikator für die RMG-Gliose bei der Maus ist die vermehrte Expression von Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP), einem Intermediärfilament im Zytoplasma von RMG (Roche et al. 2018). Die Überexpression von GFAP führt

wahrscheinlich zur erhöhten Stabilität der RMG und trägt initial zum Schutz der Neuroretina vor mechanischen Läsionen bei (Lundkvist et al. 2004).

Auch bei der DR im Rattenmodell detektieren RMG bereits frühe Veränderungen und werden gliotisch (Rungger-Brändle, Dosso, and Leuenberger 2000; Gu et al. 2019; A. J. Barber, Antonetti, and Gardner 2000; Lieth et al. 1998). Die RMG-Gliose wird dann zum Problem, wenn es zu einer Art Entgleisung kommt, die zur Schädigung der gesamten Netzhaut führt (Pasha et al. 2017). Dazu kommt es in der diabetischen Mausretina, wo ein direkter Zusammenhang zwischen der RMG-Gliose und dem Fortschreiten der Neurodegeneration beobachtet wurde (C. Liu et al. 2016). Dies legt die Bedeutung aktivierter RMG für neurodegenerative Prozesse bei der DR nahe (C. Liu et al. 2016).

Darüber hinaus kommt es bei Diabetes mellitus im Rattenmodell zum Verlust des RMG-vermittelten Schutzmechanismus, Glutamat aus dem synaptischen Spalt aufzunehmen und so eine Neurotoxizität zu verhindern (R. A. Kowluru et al. 2001; Lieth et al. 1998; Q. Li and Puro 2002; Gu et al. 2014). Demnach ist in der Netzhaut diabetischer Ratten die extrazelluläre Konzentration von Glutamat erhöht (R. A. Kowluru et al. 2001; Lieth et al. 1998; Q. Li and Puro 2002; Gu et al. 2014). Als Folge dessen wurde der vermehrte Zelltod von Nervenzellen beschrieben (Gu et al. 2014). Dieser Befund deutet darauf hin, dass eine Dysfunktion von RMG in der diabetischen Retina eine direkt neurotoxische Wirkung hervorruft (Gu et al. 2014).

Ein Makulaödem führt zu verschwommener Sicht und kann durch Druckschäden an Nervenzellen letztlich zur vollständigen Erblindung führen (H. Lee et al. 2019). RMG werden aufgrund einer dysfunktionalen Flüssigkeitshomöostase mit der Entstehung eines Makulaödems in Verbindung gebracht (Fine and Brucker 1981; Reichenbach et al. 2007; Vujosevic and Midena 2013; Spaide 2016). Das Ödem kann als extrazelluläre und intrazelluläre Flüssigkeitsansammlung auftreten (Coscas, Cunha-Vaz, and Soubrane 2010). Extrazelluläre Flüssigkeit sammelt sich in der Netzhaut unter anderem durch den Stoffwechsel der Netzhautzellen an (Bringmann et al. 2006). Durch das „potassium siphoning“ (gezielter Kaliumabtransport) sind RMG in der Lage, die extrazelluläre Flüssigkeitsmenge zu regulieren (Reichenbach and Bringmann 2013). In RMG aus Nagern ist Kir4.1 der wichtigste Kanal für die Abgabe von Kalium und damit von Flüssigkeit, die zuvor von extrazellulär aufgenommen wurde (Garcia et al. 2014; Vogler et al. 2016; Kofuji et al. 2002).

Im diabetischen Nagermodell kommt es zu einer verminderten Expression von Kir4.1 in RMG (Y Zhang et al. 2011; Pannicke et al. 2006). Infolge bricht die an den Kaliumefflux gekoppelte Flüssigkeitsabgabe zusammen, was primär zum Anschwellen von RMG (intrazelluläres Ödem) und sekundär, durch Rückstau, zum extrazellulären Ödem führt (Bringmann, Reichenbach, and Wiedemann 2004). Außerdem kommt es in der diabetischen Rattenretina zur veränderten Expression von Aquaporinen in RMG, was die physiologische Flüssigkeitshomöostase zusätzlich stört und so vermutlich die Ödementstehung begünstigt (Kida et al. 2017; Hollborn et al. 2011; Y Zhang et al. 2011).

Zusätzlich zum dysfunktionalen Abtransport von Flüssigkeit kommt es beim Makulaödem zu einem vermehrten Eintrag von Flüssigkeit in den Extrazellularraum (Cunha-Vaz 2017; Mori et al. 2002). Der Grund liegt im vermehrten Austritt von Flüssigkeit aus retinalen Blutgefäßen (Cunha-Vaz 2017). In der gesunden Netzhaut wird dies durch die physiologische Funktion der Blut-Retina-Schranken verhindert (Cunha-Vaz 2017). Diese stellen eine Barriere zwischen den retinalen Blutgefäßen und der Netzhaut dar (Cunha-Vaz 2017). Es existiert eine äußere (zwischen dem Choroid und der Netzhaut) und eine innere (zwischen dem intraretinalen Gefäßsystem und der Netzhaut) Blut-Retina-Schranke (Campbell and Humphries 2012). Die äußere Blut-Retina-Schranke entsteht durch tight junctions zwischen den Pigmentepithelzellen (Campbell and Humphries 2012). Die innere Blut-Retina-Schranke wird unter Ausbildung von tight junctions zwischen den Endothelzellen der Mikrokapillaren gebildet (Campbell and Humphries 2012). In der gesunden Netzhaut des Menschen haben RMG eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der inneren Blut-Retina-Schranke (Bianchi et al. 2015). In einem transgenen Mausmodell führt dementsprechend die Ablation von RMG zum vollständigen Zusammenbruch der inneren Blut-Retina-Schranke (Shen et al. 2012). Außerdem wurde im Rattenmodell nachgewiesen, dass RMG verschiedene Faktoren produzieren, um die Barrierefunktion dieser Schranke aufrecht zu erhalten (Abukawa et al. 2009). So produzieren RMG aus Ratten den Glial Derived Neurotrophic Factor, der die Barriereigenschaften von Endothelzellen verbessert (Zhu et al. 2012; Chaoling Dong et al. 2018; Igarashi et al. 2000). Demgegenüber steht die durch RMG-vermittelte Sekretion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der die Permeabilität von Gefäßen erhöht und die Barrierefunktion der inneren Blut-Retina-Schranke behindert (Le 2017). Ein Zusammenbruch der inneren Blut-Retina-

Schranke wurde sowohl in Patienten mit einem diabetischen Makulaödem als auch im diabetischen Schweinemodell gezeigt (Najeeb et al. 2017; Acharya et al. 2017). Es wird vermutet, dass der Zusammenbruch der inneren Blut-Retina-Schranke bei Diabetes mellitus von RMG durch eine VEGF-Überexpression initiiert wird, was die Rolle dieses Zelltyps in der Pathogenese des Makulaödems untermauert (Juanjuan Wang et al. 2010).

Trotz intensiver Forschungen sind die genauen molekularen Mechanismen, die in RMG zu den genannten Prozessen führen, weitestgehend unverstanden (McDowell et al. 2018). Jüngst wurde eine Studie an Diabetikern mit und ohne einer DR veröffentlicht, welche die bedeutende Rolle von RMG bei der DR unterstreicht (Yokomizo et al. 2019). Diabetiker, die nicht an einer DR erkrankt sind, profitieren von einem endogenen Schutzfaktor, dem Retinol Binding Protein 3 (Yokomizo et al. 2019). Dieses Protein hemmt die Aufnahme von pathologischen Glukosemengen in RMG (Yokomizo et al. 2019). Das verhindert glukoseinduzierte Veränderungen der RMG und damit auch Prozesse, die von diesem Zelltyp bei der DR ausgehen (Yokomizo et al. 2019). Das Ergebnis dieser Studie unterstreicht nicht nur die besondere Rolle von RMG, sondern auch die zentrale Bedeutung von Glukose bei der DR (Tien Y. Wong et al. 2016; Mathebula 2018; Safi et al. 2014).

2.5 Die Rolle von Glukose in der Netzhaut

2.5.1 Als der wichtigste Energielieferant

Glukose ist im zentralen Nervensystem und damit auch in der Netzhaut der wichtigste Energielieferant (Kumagai 1999). Die aus Glukose gewonnene Energie wird von Photorezeptoren in der Mäusenetzhaut sogar bei vollkommener Dunkelheit verbraucht (Millman et al. 2019). Übereinstimmend damit ist die Netzhaut eines der Organe des menschlichen Nervensystems mit dem höchsten Energieverbrauch (Wong-Riley 2010).

Prinzipiell existieren im Körper zwei Arten der Energiegewinnung aus Glukose (Yetkin-Arik et al. 2019). Das sind die Mitochondrien Atmung unter Verbrauch von Sauerstoff und die anaerobe Glykolyse, die bei Sauerstoffmangel genutzt wird (Yetkin-Arik et al. 2019). Das Besondere in der Netzhaut ist, dass einige Netzhautzelltypen bei unterschiedlichen Spezies trotz der Präsenz von Sauerstoff

Glykolyse anstelle von mitochondrialer Atmung zur Energiegewinnung nutzen (B. S. Winkler et al. 2000; M. Shamsul Ola et al. 2006; Millman et al. 2019; Petit et al. 2018; Camacho et al. 2019; Rueda et al. 2016). Dies wird auch als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet (Ng et al. 2015). Welche Zelltypen zu welchem Grad die aerobe Glykolyse zur Energiegewinnung einsetzen, ist bisher wenig erforscht und wahrscheinlich existieren speziesspezifische Unterschiede (Ng et al. 2015). Bei Mäusen wurde gezeigt, dass beide Arten der Energiegewinnung für die Funktionsfähigkeit der Netzhaut benötigt werden (Grenell et al. 2019).

Primäre RMG aus Menschen betreiben *in vitro* fast ausschließlich die aerobe Glykolyse (B. S. Winkler et al. 2000). Winkler et al. haben eine Hypothese über den möglichen Sinn dieser Art der Energiegewinnung in RMG aufgestellt: Bei akutem Sauerstoffmangel reicht ein moderater und somit zu bewältigender Anstieg der (anaeroben) Glykolyse aus, um die Energieproduktion aufrecht zu erhalten (B. S. Winkler et al. 2000). Dies würde die relative Unempfindlichkeit von RMG gegenüber Sauerstoffmangelsituationen erklären (B. S. Winkler et al. 2000). Überdies entsteht bei der aeroben Glykolyse durch RMG in der Säugetiernetzhaut Laktat, das den Nervenzellen als wertvoller Nährstoff zur Verfügung gestellt wird (C. L. Poitry-Yamate, Poitry, and Tsacopoulos 1995; Mohammad Shamsul Ola and LaNoue 2019).

Glukose erreicht die Netzhaut über die Blutzirkulation (Kumagai 1999). Zum einen über die netzhautexternen Kapillaren des Choroids zur Glukoseversorgung der äußeren Retina (Provis 2001). Zum anderen über das intraretinale Gefäßsystem zur Versorgung der inneren Retina (Provis 2001). Dabei muss die Glukose die innere und die äußere Blut-Retina-Schranke passieren (Campbell and Humphries 2012). Bei Säugetieren überwindet sie beide Barrieren durch erleichterte Diffusion über den natrium- und insulinunabhängigen Glukosetransporter Typ 1 (GLUT1), (You et al. 2017; Galochkina et al. 2019; Swarup et al. 2019; Akanuma et al. 2013; Calado et al. 2016; Kumagai 1999; Mantych, Hageman, and Devaskar 1993; Takata et al. 1992). Bei Menschen und Mäusen ist GLUT1 der einzige Glukosetransporter über die Blut-Retina-Schranken (You et al. 2017; Mantych, Hageman, and Devaskar 1993; Swarup et al. 2019).

2.5.2 Als Auslöser bei der diabetischen Retinopathie

Die Glukoseaufnahmekapazität über GLUT1 in der Netzhaut ist bei physiologischen Blutglukosekonzentrationen nicht gesättigt (Kumagai, Vinores, and Partridge 1996). Erhöhte Blutglukosekonzentrationen führen daher unmittelbar zu einer vermehrten Aufnahme von Glukose in die Retina (M. Shamsul Ola et al. 2006; Takata et al. 1992). Dementsprechend ist der Glukosegehalt in der Netzhaut diabetischer Ratten erhöht (M. Shamsul Ola et al. 2006; J. Tang et al. 2000; J.-Z. Zhang et al. 2003). Ein *in vitro* Modell der Blut-Retina-Schranke des Menschen deutet auf eine gesteigerte biologische Aktivität von GLUT1 unter diabetischen Kulturbedingungen hin, was die Aufnahme von Glukose in die Netzhaut bei Diabetes mellitus zusätzlich erhöhen könnte (You et al. 2017; Busik et al. 2002). Die experimentelle Inhibition von GLUT1 im Mausmodell führt dahingegen zu einer geringgradigeren Ausprägung der Retinopathie (L. Lu et al. 2013; You et al. 2017). Die therapeutische Hemmung von GLUT1 in der Retina von Patienten wird sogar als vielversprechender Ansatz für die Therapie der DR diskutiert (Kelly, Wang, and Zhang 2018). Dies macht die zentrale Bedeutung von erhöhten Glukosekonzentrationen in der Netzhaut bei der DR deutlich.

Tatsächlich gelten erhöhte Konzentrationen von Glukose als eine wesentliche Ursache für wichtige pathologische Mechanismen bei der DR (Tien Y. Wong et al. 2016; Mathebula 2018; Safi et al. 2014). Einer dieser Mechanismen ist der erhöhte Gehalt instabiler Sauerstoffradikale (*engl.* reactive oxygen species, kurz ROS) in der Netzhaut, was sich im diabetischen Nagermodell gezeigt hat (Miller et al. 2019; Mehrzadi et al. 2018). Generell führt das Überangebot von Glukose bei Diabetes mellitus zu einer Überlastung der Mitochondrien in den Zellen (Cecilia et al. 2019). Diese Überlastung bewirkt letztendlich einen dysfunktionalen Elektronenfluss, wobei Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden und so ROS entstehen (Cecilia et al. 2019). Die erhöhte Konzentration von ROS in der diabetischen Retina ist allerdings nicht nur auf die vermehrte Produktion sondern auch auf eine verminderte Beseitigung zurückzuführen (Zhong, Mishra, and Kowluru 2013). In der physiologischen Mäusenetzhaut ist es die Aufgabe von RMG, Antioxidantien für die Netzhaut bereitzustellen, darunter Glutathion (Navneet, Zhao, et al. 2019; Navneet, Cui, et al. 2019; Schultz et al. 2018; Grosche et al. 2016). Untersuchungen im Rattenmodell haben gezeigt, dass es bei Diabetes mellitus zum Verlust von

Glutathion kommt (Changxia Dong et al. 2019). Auch bei Patienten mit einer DR wurde eine Störung von zelleigenen antioxidativen Mechanismen festgestellt (Zhong, Mishra, and Kowluru 2013). Damit übereinstimmend haben Untersuchungen an diabetischen Ratten gezeigt, dass eine Therapie mit oralen Antioxidantien den Schweregrad der Retinopathie verbessert (Renu A. Kowluru, Tang, and Kern 2001). Ein erhöhter Gehalt von ROS gilt als eines der Schlüsselereignisse bei der Aktivierung der wichtigsten pathologischen Mechanismen diabetischer Komplikationen (Brownlee 2005). ROS führt zu einem gesteigerten Fluss durch den Polyol- und Hexosaminpfad, zur vermehrten Bildung von sogenannten „Advanced Glycation End Products“ und zu einer abnormen Signalkaskade durch Aktivierung von Proteinkinase C (Giacco and Brownlee 2010). Diese molekularen Mechanismen scheinen auch in der Pathogenese der DR eine Rolle zu spielen und wurden in zahlreichen diabetischen Retinopathiemodellen im Tier und *in vitro* nachgewiesen (Jie Tang et al. 2013; Schlotterer et al. 2018; Kim et al. 2012; Geraldés et al. 2009; Gurel et al. 2014). Der Nachweis glukoseinduzierter Pathogenesemechanismen unterstreicht die Schlüsselrolle von erhöhten Blutglukosekonzentrationen bei der Entstehung der DR.

Zudem führt die erhöhte Glukosekonzentration in der Netzhaut diabetischer Ratten zu einer Hemmung der Glykolyse (M. Shamsul Ola et al. 2006; Santiago 2009). Der Mechanismus könnte darin begründet liegen, dass ein initial gesteigerter glykolytischer Fluss (durch das Überangebot von Glukose) letztlich zur Hemmung glykolytischer Enzyme führen könnte (Mondal, Bhaduri, and Bhattacharya 2018). Damit übereinstimmend wurde in der diabetischen Rattennetzhaut die Inaktivität glykolytischer Enzyme beobachtet (M. Shamsul Ola et al. 2006; Kanwar and Kowluru 2009). In den Ratten war die Enzymaktivität sogar direkt mit der Entwicklung einer Retinopathie verknüpft (Kanwar and Kowluru 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung der Glykolyse in der diabetischen Retina eine wichtige Rolle in der Pathogenese der DR spielen könnte. Trotzdem liegen nur wenige Studien vor, die den Aspekt der Glykolysehemmung in der Pathogenese der DR berücksichtigen (Valdés et al. 2016).

2.6 Differenzielle Proteomanalyse

2.6.1 Aufklärung molekularer Pathogenesemechanismen

Das Proteom ist die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem definierten Zustand in einer Zelle oder in einem Gewebe exprimiert werden (Wilkins, Pasquali, et al. 1996; Wilkins, Sanchez, et al. 1996). Der Begriff Proteomik bezeichnet die Erforschung des Proteoms (Graves and Haystead 2002). Die differenzielle Proteomanalyse ist ein Teilgebiet der Proteomik und dient der Feststellung von Veränderungen der Proteinexpression durch eine vergleichende Analyse (Graves and Haystead 2002).

Eine veränderte (differenzielle) Proteinexpression tritt unter anderem als eine spezifische Veränderung im Rahmen einer Erkrankung auf (Apweiler et al. 2009). Will man beispielsweise die DR auf molekularer Ebene verstehen, kann man die Proteinexpression in der Netzhaut von betroffenen Patienten und Gesunden vergleichen (Yokomizo et al. 2019). Differenziell exprimierte Proteine können eine Schlüsselposition im Krankheitsgeschehen einnehmen (Yokomizo et al. 2019). Zudem ermöglicht ihre Detektion die Aufklärung von Pathogenese-assoziierten Mechanismen, wie proteomische Studien zur autoimmunen Uveitis gezeigt haben (Hauck et al. 2012; Uhl et al. 2014; Hauck et al. 2010).

2.6.2 Das Prinzip der Massenspektrometrie

Es existieren verschiedene Methoden für die differenzielle Proteomanalyse (Monteoliva and Albar 2004). Eine äußerst effektive und sensitive Methode ist die Massenspektrometrie (MS), die sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Proteinanalyse ermöglicht (Urban 2016). Die eindeutige Identifikation und Quantifizierung von Peptiden basiert auf der Bestimmung der spezifischen Molekularmassen von Peptid(fragment-)ionen anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z), (Aebersold and Mann 2003). Darüber hinaus wird die Ionenhäufigkeit je m/z erfasst (Aebersold and Mann 2003). Die Auftragung der ermittelten Ionenhäufigkeiten gegen das m/z ergibt das Massenspektrum (Paul et al. 2013).

Um vom m/z eines Peptidions auf das Herkunfts-Protein zu schließen, erfolgt der Abgleich mit einer Datenbank (Sadygov, Cociorva, and Yates 2004). Diese Datenbank beinhaltet Aminosäuresequenzen des gesamten Proteoms des

entsprechenden Organismus (Sadygov, Cociorva, and Yates 2004). Zum Identifizieren eines Proteins werden in der Datenbank per *in silico* Verdau ermittelte Peptidmassen mit tatsächlich gemessenen m/z verglichen (Sadygov, Cociorva, and Yates 2004). Durch die bei einer Fragmentierung aufgezeichneten Informationen über die Peptidfragmentationen kann die Reihenfolge der Aminosäuren in dem Peptid verifiziert werden (Sadygov, Cociorva, and Yates 2004). Anschließend kann die Aminosäuresequenz des detektierten Peptids mit der Datenbank verglichen werden, was die Zuordnung zum Herkunfts-Protein erlaubt (Sadygov, Cociorva, and Yates 2004).

Die Ionenhäufigkeit des Peptidions im Massenspektrum erlaubt zudem einen Rückschluss auf die Quantität des Peptids und ermöglicht aufsummiert die Quantifizierung des Herkunfts-Proteins (Pontes and de Sousa 2016).

2.6.3 Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie als Goldstandard

Die Tandem-Massenspektrometrie in Kombination mit der Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS) stellt den aktuellen Goldstandard in der Proteomik dar (van de Merbel 2019).

Bei der LC-MS/MS werden Proteine in einer Probe extrahiert und enzymatisch verdaut, wodurch sich definierte Peptidbruchstücke mit einem spezifischen Schnittmuster ergeben (Saveliev et al. 2013). Anschließend erfolgt eine Auftrennung der Peptidbruchstücke durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie, was die Identifikation von Peptiden aus komplexen Probengemischen optimiert (Mant et al. 2007). Die Peptide binden an eine Chromatographiesäule, werden mit steigender Acetonitrilkonzentration eluiert und direkt über eine Ionenquelle in das Massenspektrometer eingeleitet (Defaix et al. 2018). Dafür werden sie in einem Hochspannungsfeld vernebelt und ionisiert (Defaix et al. 2018). Von der Ionenquelle durchlaufen sie anschließend die nachgeschalteten Einheiten im Massenspektrometer: Den Quadrupol, der die Ionen eines ganz bestimmten m/z durch angelegte Spannungen im elektrischen Feld separiert und weiterleitet; Und den Analysator (Orbitrap), der das genaue m/z sowie die Anzahl der Ionen für genau dieses m/z zu einem definiertem Zeitpunkt erfasst (Scheltema et al. 2014). Während dieses Prozesses können Peptidionen zusätzlich durch die Kollision mit Stickstoff in der HCD-Zelle fragmentiert werden (Yi Zhang et al. 2009). Dieses Verfahren wird

dann als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet, weil alternierend Übersichtsspektren der Vorläufer-Peptidionen (MS1) erstellt werden und außerdem die Massenanalyse der Peptidfragmentionen (MS2) stattfindet (van Agthoven et al. 2019).

Wenn die Auswahl der zu fragmentierenden Vorläufer-Peptidionen auf den Ergebnissen der MS1-Spektren beruht, wird die Strategie als datenabhängige Erfassung bezeichnet (Koopmans et al. 2018). Wird die Fragmentierung aller Vorläufer-Peptidionen kontinuierlich und unabhängig von deren Signalstärke in den MS1-Spektren erzielt, spricht man von einer datenunabhängigen Erfassung (*engl.* data independent acquisition, DIA), (Koopmans et al. 2018). Hier wird der gesamte Massebereich in mehrere m/z -Fenster aufgeteilt und die Vorläufer-Peptidionen pro m/z -Fenster isoliert und gemeinsam fragmentiert (Martins-de-Souza, Faça, and Gozzo 2017). Das Resultat der DIA-Erfassung sind hochkomplexe MS2-Spektren, die theoretisch die Identifikation aller Peptidionen aus einer Probe ermöglichen, weil sie Informationen zu allen Peptidfragmentionen enthalten (Koopmans et al. 2018). Die Peptidfragmentionen müssen bei der DIA-Erfassung einem Vorläufer-Peptid zugeordnet werden (Koopmans et al. 2018). Dies erfolgt anhand einer Organismus-spezifischen Spektralbibliothek, die alle charakteristischen Fragmentierungsmuster dieses Organismus enthält und die zuvor durch eine datenabhängige Erfassungsmethode erstellt worden ist (M. Wang and Bandeira 2013). Mit diesen Informationen erfolgt dann die quantitative Auswertung mithilfe einer Software, wie zum Beispiel Spectronaut (Bruderer et al. 2015; Bruderer et al. 2016).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Für die beschriebenen Experimente wurden wiederholt Augen von Schlachtschweinen am Schlachthof München abgeholt. Eine Ausnahmegenehmigung für die Verwendung tierischer Nebenprodukte zu Forschungszwecken am Schlachthof liegt uns vor. Bei den Tieren handelte es sich um Masthybriden der Rassen Pietrain und deutsche Landrasse in einem Alter von ca. sechs Monaten. Die Augen wurden vom Schlachthofpersonal direkt nach dem Entbluten entnommen.

3.1.1 Primäre Schweine Müller Gliazellen

3.1.1.1 Präparation und Kultivierung

3.1.1.1.1 Puffer und Lösungen

Medium

CO₂ independent Medium¹

DMEM GlutaMax¹

PBS Zellkultur¹ (steril)

Zusätze

Fötale Kälberserum (FBS)¹ 10%

Penicillin-Streptomycin (PS)¹ 1%

Ringer Lösung

Ringer Pulver² 1 Tablette

In 500 ml Aqua bidest. (steril) lösen

Papain Stammlösung

Ethylendiamintetraessigsäure EDTA² (1,1 mM) 3,21 µg

B-Mercaptoethanol² (0,067 mM) 0,96 µl

L-Cystein hydrochlorid² (5,5 mM) 8,67 mg

Ad 10 ml Aqua bidest. (steril)

Verdünntes Papain

Papain³ (1:25) 10 µl

In 240 µl Papain Stammlösung verdünnen, bei 37 °C für 30 Minuten inkubieren

Verdünnte Desoxyribonuklease (DNase)

DNase² [6,5 µg/µl] 10 mg

In 1,5 ml DMEM GlutaMax lösen

¹ Thermo Fisher Scientific, Ulm

² Millipore Sigma, Taufkirchen

³ Worthington Biochemical, Troisdorf

3.1.1.1.2 Durchführung

Die Augen wurden am Schlachthof direkt nach der Entnahme in gekühltes CO₂ independent Medium gegeben und auf Eis transportiert. Die Präparation der RMG war innerhalb von drei Stunden abgeschlossen. Für den Versuch aus Kapitel 4.1 wurden neun Augen mit einer Schere grob von Bindegewebe und Muskulatur befreit, anschließend erfolgte zweimal eine je fünfminütige Desinfektion in Ethanol 80%. Die Augen wurden mit einer Schere durch einen kreisförmigen Scherenschnitt (etwa 3 mm parallel zum Limbus) eröffnet und der vordere Teil samt Glaskörper entfernt. Die Neuroretina wurde mit Pinzetten abgelöst und aus dem Augapfel entnommen. Mithilfe von zwei Pinzetten erfolgte eine Entfernung makroskopisch sichtbarer Blutgefäße, indem die Retina vorsichtig zerteilt und die Blutgefäße mit den Pinzetten herausgezogen wurden. Je fünf Retinae wurden anschließend durch 20-minütiges Schneiden mit einer Mikroschere (in kreisförmigen Bewegungen) mechanisch zerkleinert. Die entstandenen Retinastückchen wurden zweimal mit einer ausreichenden Menge Ringer Lösung (ca. 15 ml) gewaschen und der Überstand jeweils durch Absaugen entfernt. Pro fünf Retinae wurden nochmals 500 µl Ringer Lösung und 250 µl vorinkubiertes, verdünntes Papain zugesetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 12 Minuten bei 37 °C unter mehrmaligem Aufschütteln. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde DMEM GlutaMax Medium mit FBS zugegeben (ca. 1 ml). Danach erfolgte die Zugabe von 25 µl verdünnter DNase. Es wurde so lange händisch geschüttelt, bis sich keine sichtbaren Klumpen mehr bildeten. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen in DMEM GlutaMax. Danach erfolgte ein mechanisches Zerreiben (zehnmal auf- und abpipettieren) mit der abgeflamnten Spitze einer Pasteurpipette aus Glas. Die einzelnen Proben wurden vereint und es erfolgte die Aussaat in six well Platten (ca. 0,33 Retinae pro well), wobei in jedes well 2 ml DMEM GlutaMax+FBS+PS vorgelegt wurden. Nach 24 Stunden wurden nicht-adhärenente Zellen durch mehrmaliges Schwenken der Platte und subsequentes Absaugen des Mediums entfernt und frisches Medium (2 ml DMEM GlutaMax+FBS+PS pro well) vorsichtig eingefüllt. Ein Mediumwechsel erfolgte anschließend alle 48 Stunden bis zum Versuchsbeginn nach 14 Tagen in Kultur.

3.1.1.2 Behandlung unter diabetischen Kulturbedingungen

3.1.1.2.1 Lösungen

Medium

DMEM GlutaMax⁴

Zusätze

FBS ⁴	10%
PS ⁴	1%

Stammlösung D-Glukose (295 mM)

D-Glukose⁵ 531,5 mg

In 10 ml DMEM GlutaMax lösen und steril filtrieren (0,45 µm Poren)⁵

Stammlösung 2-DG (200 mM)

2-Deoxyglukose (2-DG)⁵ 328,3 mg

In 10 ml DMEM GlutaMax lösen und steril filtrieren (0,45 µm Poren)

3.1.1.2.2 Durchführung

An Tag 15 in Kultur startete eine dreitägige Behandlung, welche darauf abzielte, zwei Aspekte eines pathologischen Glukosestoffwechsels bei Diabetes mellitus zu simulieren. Wir kultivierten eine Versuchsgruppe unter hyperglykämischen Bedingungen („Hyperglykämie-Gruppe“, n=6 technische Replikate), wobei die Glukosekonzentration bei 35 mM lag. Diese hyperglykämische Glukosekonzentration wurde unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur für eine hyperglykämische Behandlung in einem diabetischen Kontext festgelegt (Valdés et al. 2016).

Für die Erstellung der hyperglykämischen Bedingung wurde D-Glukose Stammlösung (295 mM) in einer Verdünnung von 1:10 in das Kulturmedium (GlutaMax+FBS+PS, beinhaltet bereits 5,6 mM Glukose) zugesetzt.

⁴ Thermo Fisher Scientific, Ulm

⁵ Millipore Sigma, Taufkirchen

In einer weiteren Behandlungsgruppe simulierten wir eine Hemmung der Glykolyse („Glykolysehemmungs-Gruppe“, n=6 technische Replikate) durch einen Gehalt von 20mM 2-DG im Kulturmedium über 24 Stunden.

Für die Behandlung der Glykolysehemmungs-Gruppe wurde eine 2-DG Stammlösung (200 mM) in einer Verdünnung von 1:10 in das Kulturmedium (wie in der Hyperglykämie-Gruppe, 5,6 mM Glukose) während der letzten 24 Stunden des dreitägigen Versuchs zugesetzt.

Als Kontrolle diente eine Gruppe unter normoglykämischen Bedingungen („Kontrollgruppe“, n=6 technische Replikate) in DMEM GlutaMax+FBS+PS mit 5,6 mM Glukose. Die Glukosekonzentration für die normoglykämische Kontrollgruppe deckte sich so mit der physiologischen Blutglukosekonzentration von Schwein und Mensch (Güemes, Rahman, and Hussain 2016; Renner et al. 2013). Die Replikate innerhalb einer Gruppe entsprachen unterschiedlichen wells, wobei deren Position je Gruppe randomisiert über drei Platten verteilt wurde. Ein Mediumwechsel in allen Gruppen erfolgte alle 24 Stunden.

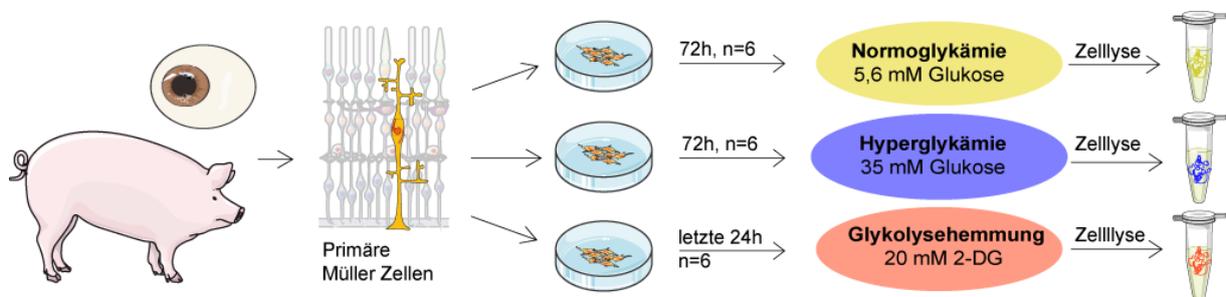


Abb. 3.1: Workflow der diabetischen Behandlung isolierter RMG mit anschließender Lyse.

3.1.1.3 Gewinnung von Proteinlysaten

Die in Kapitel 3.1.1.2.2 beschriebenen Zellen wurden zum Zwecke der massenspektrometrischen Untersuchung lysiert.

3.1.1.3.1 Puffer

PBS Zellkultur (steril)⁶

Lysepuffer

Nonyl-phenoxypolyethoxyethanol (NP40)⁷ (1%) 1 g

In 100 ml PBS Zellkultur lösen

3.1.1.3.2 Durchführung

Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurden die Zellen jeder Versuchsgruppe mit eiskaltem PBS dreimal gewaschen und unter Zusatz von 100 µl Lysepuffer pro well abgeschabt und separat gesammelt. Danach wurden Scherkräfte einer 200 µl Pipette unter Auf- und Abpipettieren angewandt und die Lyse durch Ultraschallwellen (EpiShear Probe Sonicator⁸, 5 Pulse, 1 Sekunde, 75% Intensität) durchgeführt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 10.000 rcf für zehn Minuten um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

⁶ Thermo Fisher Scientific, Ulm

⁷ Roche Diagnostics, Mannheim

⁸ Active Motif, La Hulpe, Belgien

3.1.2 Netzhautkulturen aus Schweinen

3.1.2.1 Präparation und Kultivierung

3.1.2.1.1 Puffer, Lösungen und sonstige Materialien

Handling der Neuroretina

CO₂ independent Medium⁹

Biopsiestanze¹⁰

6 mm oder 8 mm

Einmalskalpell¹¹

Glaspipette¹²

Glaspipetten Ballon¹²

Parafilm¹³

Kultursystem⁹

0,4 µm Polycarbonat Insert und passende Platte

Medium

RPMI 1640⁹

DMEM/F12⁹

Neurobasal⁹

Zusätze

FBS⁹

10%

PS⁹

1%

⁹ Thermo Fisher Scientific, Ulm

¹⁰ PFM Medical, Köln

¹¹ B. Braun, Melsungen

¹² Hirschmann, Eberstadt

¹³ Bemis, Meckenheim

3.1.2.1.2 Prinzip der Medium-zu-Luft Kultivierung

Die von uns angewandte Methode der Kultivierung erfolgt auf einer speziell beschichteten Polycarbonat-Membran mit Kontakt zu Kulturmedium unterhalb und der Umgebungsluft oberhalb. Die Membran ist in einem Insert aufgespannt, welches in die Mulde einer six well Platte passt. Dabei sorgen kleine Plastiknasen dafür, dass das Insert mit etwas Abstand zum Boden des wells steht und somit Zellkulturmedium darunter gelangt.

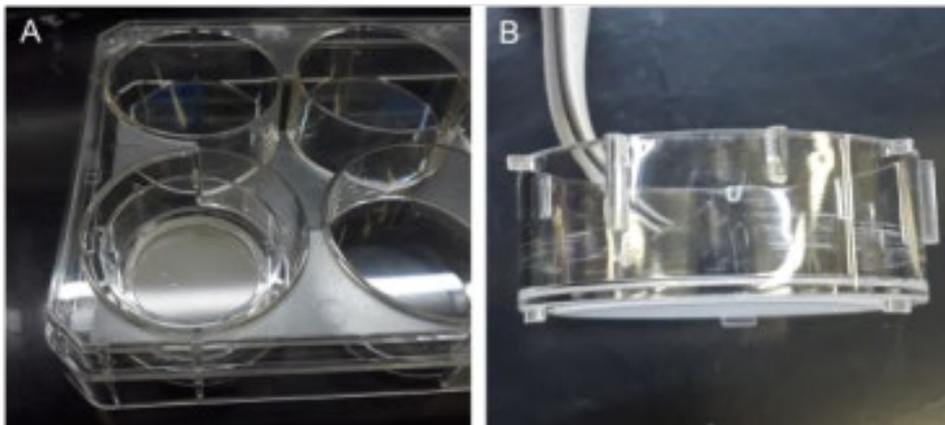


Abb. 3.2: Equipment für die Medium-zu-Luft Kultivierung

Das Medium stellt Nährstoffe von unterhalb der Membran bereit und strömt durch Kapillarkräfte durch winzige Poren ($0.4\mu\text{m}$) nach oben, sodass ein sehr dünner Film auf der Membran (und dem Explantat) entsteht, ohne dieses vollständig zu bedecken. Dies erlaubt einen sehr effektiven Gasaustausch (Bull 2011).

3.1.2.1.3 Durchführung

Die Etablierung der Arbeitsschritte und Methoden bei Präparation und Kultivierung von Netzhautkulturen des Schweines war Bestandteil dieser Arbeit und ist daher in Kapitel 4.2 detailliert beschrieben.

3.1.2.2 Fixationsprozess

3.1.2.2.1 Puffer, Lösungen und sonstige Materialien

Fixanz

Paraformaldehyd (PFA) 4%¹⁴

0,1 M Phosphatpuffer (PB)

Na₂HPO₄·2H₂O¹⁵ 24,42 g

Na₂H₂PO₄·H₂O¹⁵ 2,62 g

Ad 1 l Aqua bidest.

Entwässerung

Biopsiekapsel¹⁶

Sucrose¹⁵ (15%) 15 g

Sucrose (30%) 30 g

Ad 100 ml PB

Einbetten

Einbettform¹⁷ 8 x 12 mm

Optimal Cryo Temperature (OCT)-Medium¹⁸

3.1.2.2.2 Durchführung

Die Etablierung der Arbeitsschritte und Methoden bei der Fixation, Entwässerung und Einbettung von Netzhautkulturen des Schweines war Bestandteil dieser Arbeit und die Durchführung ist daher in Kapitel 4.2 detailliert beschrieben.

¹⁴ BosterBio, Pleasanton, USA

¹⁵ Millipore Sigma, Taufkirchen

¹⁶ CellSafe, Victoria, Australien

¹⁷ Polyscience, Hirschberg an der Bergstraße

¹⁸ Thermo Fisher Scientific, Ulm

3.1.2.3 Gewinnung von Proteinlysaten

Für den proteomischen Vergleich zwischen frischer Netzhaut und Netzhautkulturen nach drei Tagen *in vitro* (Kapitel 4.4.6) wurden sechs Explantate aus sechs Schweineaugen vom Bereich 2b (aus dem visual streak, Kapitel 4.2.1) präpariert und in RPMI 1640 Medium¹⁸+FBS¹⁸+PS¹⁸ für 72 Stunden (Mediumwechsel nach 48 Stunden) inkubiert.

3.1.2.3.1 Puffer und Lösungen

PBS Zellkultur (steril)¹⁸

Lysepuffer

Nonyl-phenoxypolyethoxyethanol (NP40)¹⁹ (1%) 1 g

In 100 ml PBS Zellkultur lösen

3.1.2.3.2 Durchführung

Die Explantate wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in speziellen „Precellys Tubes 0,5 ml“²⁰ überführt. Es folgt die Zugabe von 200 µl Lysepuffer pro Tube und die mechanische Zerkleinerung in einem Gewebe-Homogenisator „Precellys²⁰“ (Programm Nr. 3). Die Tubes wurden anschließend zehn Minuten bei 10.000 rcf zentrifugiert und der Überstand entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

¹⁹ Roche Diagnostics, Mannheim

²⁰ Bertin Instruments, Frankfurt am Main

3.1.2.4 Behandlung unter diabetischen Kulturbedingungen

Um die Expressionsminderung von SPP1 in einem diabetischen Netzhautmodell verifizieren zu können (Kapitel 4.3), haben wir Netzhautexplantate aus Schweinen wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben präpariert. Diese wurden ausschließlich aus dem Bereich 2b (aus dem visual streak, Kapitel 4.2.1) entnommen.

3.1.2.4.1 Lösungen

Medium

RPMI 1640²¹

Zusätze

FBS ²¹	10%
PS ²¹	1%

Stammlösung D-Glukose (590 mM)

D-Glukose ²²	1.063 mg
-------------------------	----------

In 10 ml DMEM GlutaMax lösen und steril filtrieren (0,45 µm Poren)²²

Stammlösung 2-DG (400 mM)

2-Deoxyglukose (2-DG) ²²	656,6 mg
-------------------------------------	----------

In 10 ml DMEM GlutaMax lösen und steril filtrieren (0,45 µm Poren)

Stammlösung Mannose (590 mM)

Mannose ²²	1.075 mg
-----------------------	----------

In 10 ml DMEM GlutaMax lösen und steril filtrieren (0,45 µm Poren)

²¹ Thermo Fisher Scientific, Ulm

²² Millipore Sigma, Taufkirchen

3.1.2.4.2 Durchführung

Die dreitägige Behandlung startete direkt nach der Präparation.

Eine Versuchsgruppe wurde unter hyperglykämischen Bedingungen (Hyperglykämie, n=4 biologische Replikate) kultiviert, wobei die Glukosekonzentration bei 70 mM lag. Dazu wurde D-Glukose Stammlösung (590 mM) in einer Verdünnung von 1:10 in das Kulturmedium (RPMI1640+FBS+PS, beinhaltet bereits 11 mM Glukose) zugesetzt. Die Konzentration von 70mM wurde unter Berücksichtigung des Faktors 6,25 zwischen normoglykämischer und hyperglykämischer Gruppe aus dem Experiment mit isolierten RMG übernommen (Kapitel 3.1.1.2.2).

In einer weiteren diabetischen Gruppe simulierten wir die Hemmung der Glykolyse („Glykolysehemmung“, n=4 biologische Replikate) durch Zusatz der 2-DG Stammlösung (400 mM) in einer Verdünnung von 1:10 in das Kulturmedium (wie bei Hyperglykämie, enthält 11 mM Glukose) während der letzten 24 Stunden des Versuchs. Auch diese Konzentration von 40 mM 2-DG wurde so berechnet, dass eine etwa 3,5-fache Überdosis von 2-DG im Vergleich zu Glukose, genau wie in dem RMG Experiment (Kapitel 3.1.1.2.2) erreicht wurde.

Als Kontrolle diente eine Gruppe mit einer Glukosekonzentration von 11 mM („Normoglykämie“, n=4 biologische Replikate), welche der Zusammensetzung des Kulturmediums entsprach (RPMI 1640+FBS+PS).

Um einen osmotischen Effekt unabhängig von der Glukosekonzentration und der Glykolysehemmung zu untersuchen, gab es außerdem eine osmotische Kontrollgruppe („Osmotische Kontrolle“, n=4 biologische Replikate) unter Zusatz von Mannose Stammlösung 590 mM 1:10 in das Kulturmedium (RPMI 1640+FBS+PS, beinhaltet bereits 11 mM Glukose). Damit wurde dieselbe Osmolarität wie in der hyperglykämischen Gruppe erreicht. Der Mediumwechsel in allen Gruppen erfolgte alle 24 Stunden.

3.1.3 Primäre Pigmentepithelzellen aus Schweinen

RPE aus Schweinen wurden für die Ko-Kultur mit organotypischen Netzhautkulturen gewonnen (Kapitel 4.2.4).

3.1.3.1 Puffer und Lösungen

1,1 mM EDTA Puffer

EDTA ²³ (1,1 mM)	3,21 µg
Ad 10 ml PBS Zellkultur ²¹ (steril)	

Dissoziationspuffer (frisch zubereitet)

L-Cystein hydrochlorid ²³ (2,99 mM)	23,57 mg
Bovines Serum Albumin (BSA, 1%) ²⁴	0,5 mg
Papain (1:1.000) ²⁵	50 µl
Ad 50 ml 1,1 mM EDTA Puffer	

Medium

DMEM GlutaMax²⁶

Zusätze

FBS ²⁶	10%
PS ²⁶	1%

²³ Millipore Sigma, Taufkirchen

²⁴ Serva, Heidelberg

²⁵ Worthington Biochemical, Troisdorf

²⁶ Thermo Fisher Scientific, Ulm

3.1.3.2 Präparation und Kultivierung

Für zwei Platten im six well Format wurden 20 Schweineaugen verwendet. Die Arbeitsschritte bis einschließlich der Entnahme der Neuroretina erfolgten wie in Kapitel 3.1.1.1.2 beschrieben. Der eröffnete Augapfel wurde mit EDTA Puffer vollständig gefüllt und 18 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Puffer vorsichtig ausgesaugt und der Augapfel erneut mit Dissoziationspuffer vollständig gefüllt (ca. 1,5 ml je Auge). Die Inkubation erfolgte für 23 Minuten bei 37 °C. Durch den enzymatischen Verdau löste sich das RPE vom Untergrund, was durch die bräunliche Eintrübung des Dissoziationspuffers sichtbar war. Mit einer 1000 µl Pipette wurde der Dissoziationspuffer im Augapfel einige Male vorsichtig auf- und abpipettiert und somit ein vollständiges Ablösen des RPE erreicht. Der Dissoziationspuffer mitsamt dem gelösten RPE wurde restlos aus dem Augapfel gewonnen und von allen 20 Augen gesammelt. Die Zellsuspension wurde mit DMEM GlutaMax+FBS+PS auf 50 ml aufgefüllt und bei 200 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 24 ml DMEM GlutaMax+FBS+PS aufgenommen. Jeweils 2 ml wurden in ein six well gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂. Nicht adhärente Zellen wurden am Folgetag durch Mediumwechsel entfernt. Es erfolgte ein Mediumwechsel alle 72 Stunden bis zum weiteren Gebrauch.

3.1.4 Frische Netzhaut aus Schweinen

FrISCHE Schweineretina wurde als Kontrolle für die bildgebenden Verfahren in Kapitel 4.4 verwendet.

3.1.4.1 Puffer, Lösungen und sonstige Materialien

Für Fixation, Entwässerung und Einbettung wurden dieselben Materialien wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben verwendet.

3.1.4.2 Fixation, Entwässerung und Einbettung

Die Reinigung, Desinfektion und Eröffnung der Augen erfolgte wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Anschließend wurde gekühltes (4 °C) PFA 4% in den Augapfel eingefüllt und die Retina bei 4 °C für drei Stunden fixiert. Das Fixanz wurde abgesaugt und das Auge durch mehrmaliges Befüllen und Absaugen mit PB gewaschen und anschließend mit PB befüllt und vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neuroretina wurde dann mitsamt allen unterliegenden Strukturen mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten (ca. 6 x 6 mm). Anschließend konnte die Neuroretina leicht mithilfe von Pinzetten vom RPE getrennt und in eine Biopsiekapsel gelegt werden. Darin erfolgte die Entwässerung in 15% bzw. 30% Sucrose in PB bei Raumtemperatur für vier Stunden bzw. über Nacht. Die Neuroretina wurde anschließend in eine zur Hälfte mit OCT befüllten Einbettform gelegt, wobei auf die Ausrichtung der Probe parallel zum Boden der Einbettform geachtet wurde. Die Probe wurde vollständig mit OCT bedeckt und die Form auf eine Konstruktion zum Schockgefrieren (bestehend aus einem Metallblock, der sich durch das Einstellen in einer Mischung aus Trockeneis und Ethanol auf ca. -72 °C abkühlt, Abb. 4.18) gestellt. Das vollständige Erhärten des OCT wurde abgewartet. Die OCT-Blöcke wurden anschließend mit Parafilm luftdicht umwickelt und bei -20 °C aufbewahrt.

3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration aus Lysaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der in Kapitel 3.1.1.3 beschriebenen RMG Lysate sowie der in Kapitel 3.1.2.3 beschriebenen Lysate aus kultivierten Netzhautexplantaten erfolgte zum Zwecke der massenspektrometrischen Proteinanalytik.

3.2.1 Puffer und Lösungen

Bradford-Reagenz

5 x Bradford Reagenz ²⁷	1 ml
Aqua bidest.	4 ml

BSA Stammlösung

BSA ²⁷ [10 mg/ml]	10 mg
Aqua bidest.	1 ml

In 100 µl Aliquots bei -20 °C lagern

²⁷ Serva, Heidelberg

3.2.2 Durchführung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von Bradford etablierten Methode (Bradford 1976). Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet dabei mit den im Lysat vorliegenden Proteinen Komplexe. Auf diese Weise verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Die Proteinmenge der Proben kann anhand der hierzu proportionalen Absorption bestimmt werden. Zur Kalibrierung der Eichgerade wurde eine Standardreihe mit BSA Stammlösung erstellt. Dazu wurde diese in Konzentrationen von 0 (Leerwert), 0,25, 0,5, 1, 2 und 4 mg/ml im Lysepuffer (hier PBS 1% NP40, Kapitel 3.1.1.3 und 3.1.2.3) gelöst. Jeweils 1 µl der Standardreihe wurde in entsprechende Küvetten²⁸ (1,5 ml halbmikro) pipettiert und anschließend mit 1 ml des Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektrophotometer²⁹ (Ultrospec 3300 pro) photometrisch bestimmt. Die Eichgerade wurde gespeichert und als Referenz verwendet. Anschließend wurde wie beschrieben mit den zu bestimmenden Proben verfahren (1 µl pro Probe in 1 ml Bradford-Reagenz), die photometrische Messung durchgeführt und die Proteinkonzentration entsprechend der der Eichgeraden abgelesen.

²⁸ Brand, Wertheim

²⁹ GE Healthcare, Freiburg

3.3 Massenspektrometrie

Zur differenziellen Proteinanalytik der RMG Lysate aus Kapitel 3.1.1.3 sowie der in Kapitel 3.1.2.3 beschriebenen Netzhautlysate wurde im Anschluss an die beschriebene Proteinbestimmung (Kapitel 3.2) eine Analyse mittels LC-MS/MS Massenspektrometrie durchgeführt. Diese erfolgte mit einer datenunabhängigen Erfassungsmethode.

3.3.1 FASP-Verdau

3.3.1.1 Puffer und Lösungen

1 M Dithiothreitol (DTT)

DTT³⁰ (1 M) 15,42 mg

In 1 ml HPLC Wasser³⁰ lösen

Urea A-Puffer (UA)

Harnstoff³⁰ (8 M) 48,03 mg

1 M Tris-HCl pH 8,5 (100 mM) 100 µl

Ad 1 ml HPLC Wasser³⁰

300 mM Iodacetamid

2-Jodacetamid³⁰ (300 mM) 55,4 mg

In 1 ml HPLC Wasser lösen

Ammoniumbicarbonat-Puffer (ABC)

ABC³⁰ (50 mM) 19,75 mg

In 5 ml HPLC Wasser³⁰ lösen

Lys-C

Lysyl Endopeptidase³¹ (0,5 mg/ml) 20 µg

In 40 µl ABC lösen

³⁰ Millipore Sigma, Darmstadt

³¹ Wako, Neuss

Trypsin

Trypsin³² (1 mg/ml) 20 µg
In 20 µl ABC lösen

5% Acetonitril (ACN)

ACN³³ (5%) 50 µl
Ad 1 ml ABC

Trifluoressigsäure (TFA)³⁴

³² Promega, Mannheim

³³ Millipore Sigma, Taufkirchen

³⁴ Applied Biosystems, Darmstadt

3.3.1.2 Durchführung bei den Lysaten aus Müller Gliazellen

Eine Proteinmenge von 10 µg pro Probe wurde, zur Vorbereitung auf ihre massenspektrometrische Analyse, einem „filter-aided sample preparation“ (FASP)-Verdau (Wiśniewski et al. 2009; Grosche et al. 2016) unterzogen. Dazu wurden die Eluate auf ein Gesamtvolumen von 400 µl mit ABC verdünnt. Es folgten die Zugabe von 1 µl 1 M DTT und eine 30-minütige Inkubation bei 60 °C auf dem Schüttler (500 rpm). Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt, mit je 600 µl UA verdünnt und mit 10 µl 300 mM Iodacetamid für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden nochmals 2 µl DTT zugesetzt. Währenddessen wurden 30 kDa Cut-off-Filter (Vivacon 500)³⁵ mit je 200 µl ABC vorgewaschen (10.000 rcf, fünf Minuten, RT). Die Proben wurden auf die angefeuchteten Filter gegeben und abzentrifugiert (10.000 rcf, 15 Minuten, RT). Die Durchläufe wurden verworfen und die Filter anschließend dreimal mit 200 µl UA und dreimal mit 100 µl ABC gewaschen, wobei die Durchläufe ebenfalls verworfen wurden. Danach erfolgte die Zugabe von je 40 µl ABC und 1 µl Lys-C sowie, nach zweistündiger Inkubation bei RT, 1 µl Trypsin. Damit wurden die Filter bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 15 Minuten bei RT und 10.000 rcf. Die Durchläufe, die nun die Peptide enthielten, wurden gesammelt (Durchlauf 1). Zuletzt wurden 20 µl 5% ACN auf die Filter gegeben, erneut abzentrifugiert (10.000 rcf, 15 Minuten, RT) und der Durchlauf mit Durchlauf 1 zusammengeführt. Die so gewonnenen Eluate wurden nach Bedarf mit ca. 1 µl TFA angesäuert und bis zur Analyse mittels LC-MS/MS bei -20°C aufbewahrt.

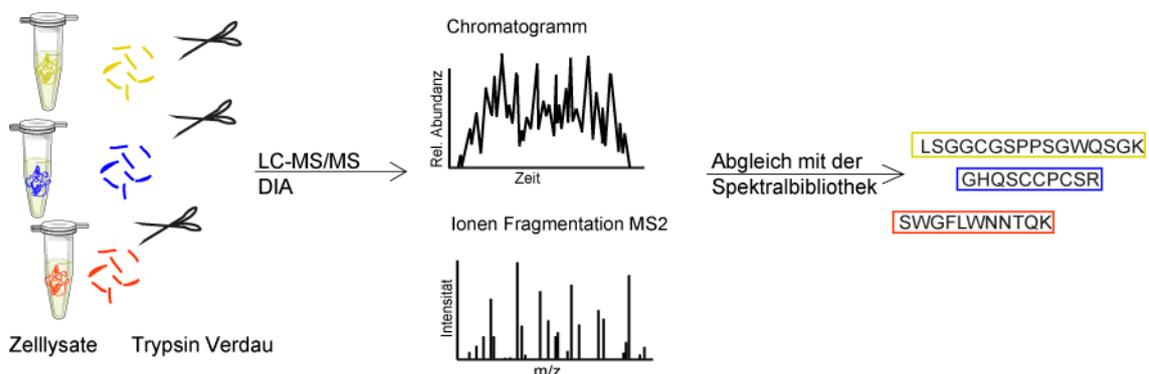


Abb. 3.3: Workflow des Proteinverdau sowie der massenspektrometrischen Analyse

³⁵ Sartorius, Göttingen

3.3.1.3 Durchführung bei den Lysaten aus Netzhautkulturen

Der FASP-Verdau wurde, wie für die RMG Lysate in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Proteinmenge war ebenfalls 10 µg pro Explantat und die Proteinlysate wurden mit 100 µl ABC bzw. 200 µl UA verdünnt. Alle anderen Arbeitsschritte erfolgten exakt wie mit den RMG Lysaten.

3.3.2 LC-MS/MS

3.3.2.1 Müller Gliazellen unter diabetischen Kulturbedingungen

3.3.2.1.1 Puffer und Lösungen

Puffer A

ACN ³⁶ 2%	20 ml
Ameisensäure ³⁶ 0,1%	1 ml
Ad 1 l HPLC Wasser ³⁷	

Puffer B

ACN 98%	980 ml
Ameisensäure 0,1%	1 ml
Ad 1 l HPLC Wasser	

³⁶ Millipore Sigma, Taufkirchen

³⁷ Millipore Sigma, Darmstadt

3.3.2.1.2 Durchführung

Die Analyse mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde unter der Leitung von Frau Dr. Hauck (Leitung der Research Unit Protein Science, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt.

Die Analyse erfolgte, wie zuvor beschrieben (Lepper et al. 2018; Mattugini et al. 2018), mit einem Q Exactive HF Massenspektrometer (Thermo Scientific) in einer datenunabhängigen Erfassung. Dieses ist mittels einer Nano Spray Ionenquelle online an ein Ultimate3000 nano RSLC System³⁸ (Ultimate 3000 RSCL; Dionex) gekoppelt. Für die chromatographische Auftrennung wurden die Peptide (ca. 0.5 µg pro Probe) zuerst automatisch auf eine Vorsäule³⁹ (300 µm innerer Durchmesser x 5 mm, gepackt mit Acclaim PepMap 100 C18, 5 µm, 100 Å Material) geladen und eluiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung auf der analytischen Säule⁴⁰ (nanoEase MZ HSS T3 Column, 100 Å, 1,8 µm, 75 µm x 250 mm) in einem Gradienten von 3% bis 40% ACN bei einer Flussrate von 250 nl/min in einem Zeitraum von 105 Minuten. Die MS1 Peptidspektren der Vorläuferpeptide wurden von 300 bis 1650 m/z mit einer Auflösung von 120.000 und einer maximalen Injektionszeit von 120 ms aufgezeichnet, um einen AGC-Wert (Automatic Gain Control) von 3e6 zu erreichen. Alle Peptidionen aus den MS1 Vorseans wurden für die Fragmentanalyse (datenunabhängige Erfassung) ausgewählt. Die Fragmentspektren wurden in 37 überlappenden DIA-Isolationsfenstern (1 Da Überlappung auf jeder Seite) variabler Größe aufgezeichnet, sodass diese insgesamt 300 bis 1650 m/z abdeckten, jeweils mit einer Auflösung von 30.000, mit einem AGC-Ziel von 3e6 und einer normierten Kollisionsenergie von 27.

³⁸ Thermo Fisher Scientific, Ulm

³⁹ LC Packings, Sunnyvale, USA

⁴⁰ Waters, Milford, USA

3.3.2.1.3 Abgleich mit der Spektralbibliothek und Quantitative Analyse

Die Analyse der gewonnenen Spektren erfolgte mithilfe der Spectronaut Software (Version 12)⁴¹, (Bruderer et al. 2015; Bruderer et al. 2016). Dazu erfolgte ein Abgleich der aufgenommenen MS/MS-Spektren mit einer in-house Schweine-Spektralbibliothek, welche mit der Spectronaut 12 Software und der Ensembl Pig database (Release 75, Sscrofa10.2) generiert wurde. Dabei wurden Standardeinstellungen gewählt. Die Falschpositivrate für die Peptididentifikation wurde auf < 1% festgelegt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der MS2 Fragmentspektren, wobei nur Precursor Signale mit einem q < 0,01 in mindestens 20% aller Proben berücksichtigt wurden. Die Quantifizierung basierte dabei ausschließlich auf den proteotypischen (uniquen) Peptiden des entsprechenden Proteins. Die normalisierten Proteinabundanzen wurden in Microsoft Excel exportiert und für die Berechnung der Abundanzverhältnisse zwischen den einzelnen Gruppen und deren Signifikanzlevel verwendet.

3.3.2.1.4 Auswertung der Proteinabundanzen

Die Proteinabundanzen in den diabetischen Behandlungsgruppen wurden jeweils mit der entsprechenden Proteinabundanz in der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt (normalisierte Abundanzwerte). Zur Beschreibung des Signifikanzniveaus wurde ein ungepaarter Student's t-Test durchgeführt, basierend auf den normalisierten, log₂ transformierten Abundanzwerten des jeweiligen Proteins. Diese Art des Signifikanztests wurde ausgewählt, da bei einer log₂ Transformation der Abundanzwerte von einer Normalverteilung der Proteinabundanzen im Proteom auszugehen ist. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant eingestuft. Proteine, deren Quantifizierung auf nur einem unigen Peptid beruhte, wurden von allen weiteren Analysen ausgeschlossen. Für einige Analysen wurde ein Mindestwert für die Veränderung des Abundanzverhältnisses von ≤ 0,75-fach bzw. ≥ 1,33-fach angewendet. Um einen künstlich gewählten Mindestwert zu vermeiden, wurde der durchschnittliche Variationskoeffizient CV der einzelnen Gruppen berechnet (was einen durchschnittlichen CV von 13,2% in der Kontrollgruppe, 12,0% in der Hyperglykämie-Gruppe und 14,1% in der Glykolysehemmungs-Gruppe ergab). Der

⁴¹ Biognosys, Schlieren, Schweiz

Mindestwert wurde so gewählt, dass er das Doppelte des maximalen Gruppen-CV überschritt.

Jede Gruppe bestand ursprünglich aus sechs technischen Replikaten. In der Kontrollgruppe wurden zwei Replikate aufgrund einer abweichenden Abundanzreaktion gegenüber allen anderen Replikaten ausgeschlossen, weil diese auch durch die Normalisierung nicht zu korrigieren war.

3.3.2.1.5 Statistische und funktionelle Analyse differenziell exprimierter Proteine

Die Vulkanplots (Abb. 4.2 und 4.4) wurden in Microsoft Excel erstellt. Die x-Achse zeigt die log₂ transformierten Abundanzverhältnisse aller identifizierten Proteine (mit ≥ 2 unigen Peptiden) zwischen der jeweiligen Behandlungsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Die y-Achse zeigt die korrespondierenden negativen log₁₀ transformierten Signifikanzwerte p. Die Referenzlinien kennzeichnen einen p-Wert von 0,05 (waagrecht Linie) und eine 1,33 bzw. 0,75-fache differenzielle Expression (senkrechte Linien).

Die Hauptkomponentenanalyse (Abb. 4.1) wurde mit Perseus (Version 1.6.0.7, Max-Planck-Institut für Biochemie, München, Deutschland, <http://www.perseus-framework.org>) erstellt. Dabei wurden die normalisierten, log₂ transformierten Abundanzen mit dem Median der Abundanzen aus allen Replikaten aller Gruppen ins Verhältnis gesetzt. Einschlusskriterium war die Quantifizierung mit mindestens zwei unigen Peptiden (Tyanova et al. 2016).

Die Pathway-Analysen (Abb. 4.3. und 4.5) wurden separat für die Behandlungsgruppen Hyperglykämie und Glykolysehemmung mit Genomatix Generanker (Genomatix Software GmbH, München, Deutschland, <http://www.genomatix.de>) durchgeführt, unter Verwendung von EIDorado (Version 04-2019) und der Literature Mining Datenbank (Version 02-2019). Einschlusskriterien für Proteine waren (a) der p-Wert $< 0,05$, (b) die Quantifizierung mit ≥ 2 unigen Peptiden und (c) ein $\geq 1,33$ -faches oder $\leq 0,75$ -faches Abundanzverhältnis in der jeweiligen diabetischen Behandlungsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Pathway-Analysen erfolgten bewusst anhand aller signifikant veränderten Proteine (d.h. mit verminderter und erhöhter Expression) der jeweiligen Gruppe, um die Relevanz dysregulierter Pfade möglichst genau zu ermitteln (García-Campos,

Espinal-Enríguez, and Hernández-Lemus 2015). Die Gennamen der eingepflegten Proteine wurden unter Angabe von *H. sapiens* als Organismus für die Hintergrundliste hochgeladen.

Für die Erstellung des Netzwerks interagierender Proteine (Abb. 4.7) aus den in beiden diabetischen Behandlungsgruppen übereinstimmend veränderten Proteinen haben wir STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Proteins, Version 11.0, STRING-Konsortium 2017, <https://string-db.org>) verwendet, das zu den Core Data Resources von ELIXIR gehört (Szklarczyk et al. 2019). STRING wurde mit der Einstellung „highest confidence“ in Bezug auf den Interaktionsscore angewendet. Zusätzlich wurden isolierte Knoten ausgeblendet. Dickere Linien verweisen auf eine stärkere Assoziation der Proteine. Einschlusskriterien waren (a) der p-Wert < 0,05, (b) die Quantifizierung mit ≥ 2 unigen Peptiden und (c) eine $\geq 1,33$ -fache oder $\leq 0,75$ -fache Expressionsänderung in beiden diabetischen Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe. Während der Eingabe verwendeten wir Gennamen und *H. sapiens* als Organismus für die Hintergrundliste.

Die Zuordnung und Kategorisierung von ECM-Proteinen (Tabelle 4.1, 4.2 und 4.3) erfolgte mithilfe der human matrixome database aus dem Matrisom-Projekt (Naba et al. 2016). Die Autoren des Matrisom-Projekts stellen außerdem das ECM-Proteom von Maus, Zebrafisch, Rundwurm und Fruchtfliege zur Verfügung (Naba et al. 2016; Nauroy et al. 2018; Teuscher et al. 2019; Davis, Horne-Badovinac, and Naba 2019). Aufgrund der Ähnlichkeit von Schweinen und Menschen hinsichtlich des Proteoms bzw. Genoms in bisherigen wissenschaftlichen Fragestellungen (Dawson et al. 2017; Bennike et al. 2014), haben wir uns für den Abgleich mit der human matrixome database entschieden.

Die Zuordnung zu den Adhäsionsproteinen erfolgt mithilfe der Gene Ontology Bezeichnung (Tabelle 4.3).

3.3.2.1.6 Erstellung von Grafiken

Der Workflow in Abb. 3.1 und 3.3 wurde mit der medizinischen Bilddatenbank Servier Medical Art gestaltet, die unter der Creative Commons License CC-BY (<https://smart.servier.com/>) erhältlich ist.

Zur Veranschaulichung der übereinstimmenden Regulation einiger Proteine in beiden diabetischen Behandlungsgruppen (Abb. 4.6) wurde BioVenn verwendet (Tim Hulsen, <http://www.biovenn.nl/>), (Hulsen, de Vlieg, and Alkema 2008)). Einschlusskriterien waren (a) der p-Wert $< 0,05$, (b) die Quantifizierung mit ≥ 2 unique Peptiden und (c) ein $\geq 1,33$ -faches oder $\leq 0,75$ -faches Abundanzverhältnis in beiden diabetischen Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe.

3.3.2.2 Schweinenetzhautkulturen

Die massenspektrometrische Analyse der in Kapitel 4.4.6 beschriebenen Netzhautkulturen (n=6 biologische Replikate) wurde mit identischen Einstellungen an einem Q Exactive HF-X Massenspektrometer mit datenunabhängiger Erfassung durchgeführt (wie in Kapitel 3.3.2.1.2). Die Analyse erfolgte abermals unter der Leitung von Frau Dr. Hauck (Leitung der Research Unit Protein Science, Helmholtz Zentrum München). Auch die Erstellung der Spektralbibliothek sowie die Identifizierung und Quantifizierung verlief identisch wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben.

3.3.2.2.1 Abundanzplot

Der Abundanzplot in Abb. 4.28 basiert auf dem Vergleich mit einem proteomischen Datensatz aus frischer Schweineretina (n=3 biologische Replikate), der von Frau Dr. Hauck zur Verfügung gestellt wurde. Der Abundanzplot wurde in Microsoft Excel erstellt. Die x-Achse zeigt die Abundanzverteilung von Proteinen in kultivierter Retina, die y-Achse in frischer Retina. Dazu wurden für alle in beiden Geweben identifizierten Proteine jeweils die Mittelwerte der Abundanzen der Replikate \log_{10} transformiert.

3.4 H&E Färbungen von Schweinenetzhaut

Die H&E Färbung wurde sowohl für den Aufbau (Kapitel 4.2) als auch die Charakterisierung des Schweinenetzhautmodells über 14 Tage in Kultur (Kapitel 4.4.1) angewendet. Als Kontrolle zu den kultivierten Explantaten wurde frische Retina mitgefärbt (Kapitel 3.1.4). Die Fixation, Entwässerung und Einbettung von Netzhautkulturen wird detailliert in Kapitel 4.2.5 beschrieben. Betreffend der frischen Retina finden sich die Angaben dazu in Kapitel 3.1.4.2.

3.4.1 Lösungen und sonstige Materialien

Hämalaun

Mayers Hämalaunlösung⁴²

Eosin

Eosin G-Lösung 0,5% wässrig⁴³

Aufsteigende Ethanolreihe

Ethanol ⁴⁴ in Aqua bidest.	70%
Ethanol in Aqua bidest.	96%
Ethanol in Aqua bidest.	100%
Isopropanol ⁴²	
Xylol ^{42,42}	

Deckgläser

Nr. 1,5⁴⁵

Eindeckelmedium

RotiMount⁴³

⁴² Millipore Sigma, Darmstadt

⁴³ Carl Roth, Karlsruhe

⁴⁴ Süsse Labortechnik, Gudensberg

3.4.2 Erstellung von Kryoschnitten

OCT-Blöcke wurden hergestellt wie in den Kapiteln 4.2.5 und 3.1.4.2 beschrieben. Die Blöcke wurden in einem Kryostat bei -19 °C Umgebungstemperatur mit einer Schnittdicke von 18 µm geschnitten. Der Block wurde möglichst genau im 90° Winkel auf dem Probenhalter des Kryostats ausgerichtet und mit OCT festgefroren. Die Schnitte wurden mit Objektträgern Superfrost Plus⁴⁵ aufgenommen und sofort einer H&E Schnellfärbung unterzogen.

3.4.3 Durchführung

Die Schnitte wurden für eine Minute in Hämalaun Lösung getaucht und anschließend unter fließendem Leitungswasser vorsichtig bis zur Entfärbung gewaschen (leichten Wasserstrahl über Objektträgerrückseite fließen lassen). Anschließend wurden die Objektträger für eine Minute in Eosin Lösung getaucht und nochmals mit Leitungswasser gewaschen. Danach erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Inkubation für jeweils 30 Sekunden pro Konzentration. Die Schnitte wurden jeweils eine Minute in zwei Küvetten Isopropanol gelegt und anschließend abermals für jeweils eine Minute zweimal in Xylol belassen. Danach wurde der Schnitt mit Eindeckelmedium benetzt und mit Deckgläsern bedeckt.

3.4.4 Mikroskopische Auswertung

Die Aufnahmen wurden an einem Leica DMI8 Mikroskop mit der Farbkamera DMC2900 angefertigt. Als Objektive wurden das HC PL FLUOTAR 10x/0.30 DRY sowie das HC PL APO 40x/0.95 DRY von Leica verwendet. Als Okular diente das Eyepiece HC PLAN 10x/20 BR mit einer zehnfachen Vergrößerung. Die totale Vergrößerung errechnet sich als Produkt aus den Werten des Objektivs und des Okulars und ist jeweils in der Beschriftung der Abbildungen in Kapitel 4.2 und 4.4 angegeben. Als Software zur Beurteilung und Dokumentation der Bilder diente die Leica Application Suite LASX (Version 3.03).

⁴⁵ Thermo Fisher Scientific, Ulm

3.5 Immunhistologische Färbungen von Schweinenetzhaut

3.5.1 Charakterisierung des Schweinenetzhautmodells

Zur Charakterisierung von Netzhautexplantaten über 14 Tage *in vitro* (Kapitel 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4, 4.4.5) wurde die Expression ausgesuchter Proteine mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Dabei erfolgte die Färbung nach 3, 6, 9 und 14 Tagen in Kultur sowie auf frischer Retina als Kontrolle (n=3 pro Zeitpunkt). Präparation, Kultivierung und Fixation sowie Entwässerung und Einbettung erfolgten wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Zwölf Explantate aus zwölf Schweineaugen wurden vom Bereich 2b (aus dem visual streak, Kapitel 4.2.1) präpariert und in RPMI 1640 Medium⁴⁶+FBS⁴⁶+PS⁴⁶ für die entsprechende Zeitspanne (Mediumwechsel alle 48 Stunden) inkubiert. Die frische Retina wurde aus derselben Region (2b) aus drei Schweineaugen entnommen (Kapitel 4.2.1).

Als Kontrollgruppe diente frische Netzhaut, die wie in Kapitel 3.1.4 prozessiert wurde.

3.5.1.1 Puffer, Lösungen und sonstige Materialien

Waschpuffer

0,1 M Phosphatpuffer (PB)

Na₂HPO₄ 2H₂O⁴⁷ 24,42 g

Na₂H₂PO₄H₂O⁴⁷ 2,62 g

Ad 1 l Aqua bidest.

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBS-T)

NaCl⁴⁷ (150 mM) 8,77 g

Tris-HCL⁴⁸ (7,7 mM) 1,21 g

Tween 20⁴⁸ (0,1%) 5 ml

Ad 1 l Aqua bidest.

⁴⁶ Thermo Fisher Scientific, Ulm

⁴⁷ Millipore Sigma, Taufkirchen

⁴⁸ Carl Roth, Karlsruhe

Inkubationspuffer

BSA ⁴⁹ (1%)	10 g
Ziegenserum ⁵⁰ (0,5%)	5 ml
Ad 1 TBS-T	

Eindeckelmedium

FluorSave, wässrig⁵¹

Fluorochrom Kernfärbung

HOECHST 33342 ⁵² (1:10.000)	5 µl
In 50 ml PB verdünnen	

Parafilm⁵³

3.5.1.2 Erstellung von Kryoschnitten

Die Erstellung der Schnitte erfolgte wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben.

⁴⁹ Serva, Heidelberg

⁵⁰ Abcam, Berlin

⁵¹ Millipore Sigma, Darmstadt

⁵² Thermo Fisher Scientific, Ulm

⁵³ Bemis, Meckenheim

3.5.1.3 Antikörper

Folgende Primärantikörper fanden bei der Charakterisierung von Netzhautexplantaten Verwendung:

Antikörper	Wirt	Klonalität	Hersteller	Verd.
Anti-GFAP	Kaninchen	Polyklonal	Agilent Dako, Hamburg	1:200
Anti-CRALBP	Maus	Monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:50
Anti-GS	Maus	Polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg	1:50
Anti-NEFH	Kaninchen	Polyklonal	Millipore Sigma, Taufkirchen	1:500
Anti-S-Opsin Klon 2B711	Ratte	Monoklonal	Dr. Kremmer, Helmholtz Zentrum München	1:10
Anti-Cone Arrestin	Kaninchen	Polyklonal	Zur Verfügung gestellt von C. Craft	1:10.000

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper	Wirt	Klonalität	Hersteller	Verd.
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa 488	Ziege	Polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:500
Anti-Maus IgG (H+L) Alexa 488	Ziege	Polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:500
Anti-Maus IgG (H+L) Alexa 568	Ziege	Polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:500
Anti-Ratte IgG (H+L) Alexa 568	Ziege	Polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:500

3.5.1.4 Durchführung

Die Schnitte wurden aus dem -20 °C Gefrierfach entnommen und 45 Minuten lang bei Raumtemperatur angetrocknet. Anschließend folgten drei Waschschriffe zu je zehn Minuten in Waschpuffer. Die Schnitte wurden dann durch Benetzen mit Inkubationspuffer und abdecken mit Parafilm für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper in mindestens 50 µl Inkubationspuffer pro Schnitt über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C (abgedeckt mit Parafilm). Bei Doppelfärbungen wurden zwei primäre Antikörper unterschiedlicher Wirtstiere gleichzeitig inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch drei Waschschriffe mit Waschpuffer entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Proben in der feuchten Kammer über 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Parafilm mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Bei Doppelfärbungen wurden die entsprechenden Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren gleichzeitig inkubiert. Nach drei Waschschriffen mit Waschpuffer erfolgte eine Inkubation zur Kenntlichmachung der Zellkerne mit HOECHST, 1:10.000 in Waschpuffer für zehn Minuten bei Raumtemperatur und nachfolgend ein Waschschriff. Die Schnitte wurden dann mit dem Eindeckelmedium bedeckt und blasenfrei mit Deckgläschen der Nr. 1,5 eingedeckelt.

3.5.1.5 Mikroskopische Auswertung

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden am Leica DMI8 Mikroskop mit der Leica DFC365 FX Kamera erstellt. Als Objektive wurden das HC PL APO 40x/0.95 DRY sowie das HC LP APO CS2 63x/1.20 WATER UV verwendet, als Okular diente das Eyepiece HC PLAN 10x/20 BR mit einer zehnfachen Vergrößerung. Die totale Vergrößerung errechnet sich als Produkt aus den Werten des Objektivs und des Okulars und ist jeweils in der Bildbeschriftung angegeben. Drei Fluoreszenzfilter für Fluor 488 green-fluorescent dye (Extension: 450-490; Emission: 500-550), Fluor 568 orange-fluorescent dye (Extension: 540-580; Emission: 592-668) und HOECHST 33342 blue-fluorescent dye (Extension: 325-375; Emission: 443-485) der Firma JH Technologies, Fremont, USA wurden verwendet. Alle Aufnahmen wurden mit der Leica Software Application Suite LASX (Version 3.03) angefertigt und beurteilt. Zu vergleichende Aufnahmen betreffend denselben Primärantikörper wurden mit identischen Einstellungen für Belichtungszeit und Helligkeit aufgenommen. Für bestimmte Aufnahmen (Hinweis in der Bildbeschreibung) wurde eine Dekonvolution mit der Huygens Software (Version 15.05)⁵⁴ durchgeführt. Dazu wurden die Aufnahmen zuerst als z-Stapel mit einer z-Höhe von max. 1 µm angefertigt. In Abb. 4.26 wurde der z-Stapel mithilfe der Leica Software in eine 3-D Projektion gewandelt.

⁵⁴ Scientific Volume Imaging, Hilversum, Niederlande

3.5.2 Verifizierung von SPP1

Für die Verifizierung der SPP1-Expression auf Netzhautkulturen des Schweines (Kapitel 4.3) wurden jeweils vier Netzhautexplantate pro Versuchsgruppe (Hyperglykämie, Glykolysehemmung, Normoglykämie, Osmotische Kontrolle), wie in Kapitel 3.1.2.4 beschrieben, kultiviert. Die Fixation, Entwässerung und Einbettung erfolgte wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben. Der Vorgang des Schneidens der OCT-Blöcke, des Färbens sowie der Auswertung erfolgte identisch wie in Kapitel 3.5 beschrieben.

Es erfolgten Doppelfärbungen mit Anti-SPP1 und Anti-Vimentin (n=4 pro Versuchsgruppe) sowie mit Kaninchen IgG und Anti-Vimentin (n=3 pro Versuchsgruppe) als eine Negativkontrolle. Die Negativkontrolle ergab keine Färbung, sodass von einem spezifischen SPP1-Expressionsmuster auszugehen war (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.1 Antikörper

Antikörper	Wirt	Klonalität	Hersteller	Verd.
Anti-SPP1	Kaninchen	Polyklonal	Origene, Herford	1:250
Anti-Vimentin	Maus	Monoklonal	Millipore Sigma, Taufkirchen	1:40
Kaninchen IgG	Kaninchen	-	Abcam, Berlin	1:1000

Folgende Sekundärantikörper wurden eingesetzt:

Antikörper	Wirt	Klonalität	Hersteller	Verd.
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa 488	Ziege	Polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:500
Anti-Maus IgG (H+L) Alexa 568	Ziege	Polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:500

4 ERGEBNISSE

4.1 Differenzielle Proteomanalyse von RMG unter diabetischen Kulturbedingungen

4.1.1 Hyperglykämie und Glykolysehemmung veränderten das gesamte RMG-Proteom

Ein Ziel dieser Arbeit war, Veränderungen im Proteom primärer Schweine RMG zu untersuchen, welche in Zellkultur durch diabetische Kulturbedingungen (Hyperglykämie und Glykolysehemmung) induziert wurden. Die quantitative Auswertung der Proteinexpression erfolgte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Zellen, die unter normoglykämischen Bedingungen kultiviert wurden. Durch die massenspektrometrische Analyse konnten wir in allen drei Gruppen und allen Replikaten (n=6 technische Replikate pro Gruppe) konsistent 2744 Proteine mit ≥ 2 unigen Peptiden identifizieren.

Um die Unterschiede zwischen allen Replikaten im gesamten Proteom darzustellen, haben wir eine Hauptkomponentenanalyse mit allen 2744 identifizierten Proteinen durchgeführt (Abb. 4.1). Die Hauptkomponentenanalyse dient der vereinfachten Darstellung proteomischer Datensätze (Alonso-Gutierrez et al. 2015). Viele statistische Variablen werden dabei in zwei „Hauptkomponenten“ zusammengefasst (Alonso-Gutierrez et al. 2015). Jeder Punkt steht für das Proteom eines Replikats einer Gruppe, wobei Replikate der drei Gruppen in unterschiedlichen Farben dargestellt sind (zwei Replikate der Kontrollgruppe wurden für diese und alle weiteren Analysen aufgrund einer, gegenüber allen anderen Replikaten, abweichenden Abundanzreaktion ausgeschlossen). In Bezug auf das Abundanzmuster ihres Proteoms werden ähnliche Replikate entlang einer Hauptkomponente nahe nebeneinander eingeordnet (Alonso-Gutierrez et al. 2015).

Die Hauptkomponentenanalyse ergab eine klare Zuordnung der einzelnen Replikate zu den entsprechenden Behandlungsansätzen (Abb. 4.1). Die Replikate der drei Behandlungsansätze gruppieren sich dabei jeweils entlang der Hauptkomponente 2. Diese Gruppierung machte die Unterschiede zwischen den Behandlungen auf Ebene des Gesamtproteoms deutlich. Entlang der Hauptkomponente 1 fand hingegen keine Gruppierung der Replikate dem Behandlungsansatz entsprechend statt. Daraus war abzulesen, dass in allen drei Behandlungsansätzen dieselben Unterschiede zwischen den Replikaten innerhalb des jeweiligen Ansatzes hervorgerufen wurden.

Somit repräsentierte die Hauptkomponente 1 die biologische Variabilität der Proben unabhängig vom Behandlungsansatz.

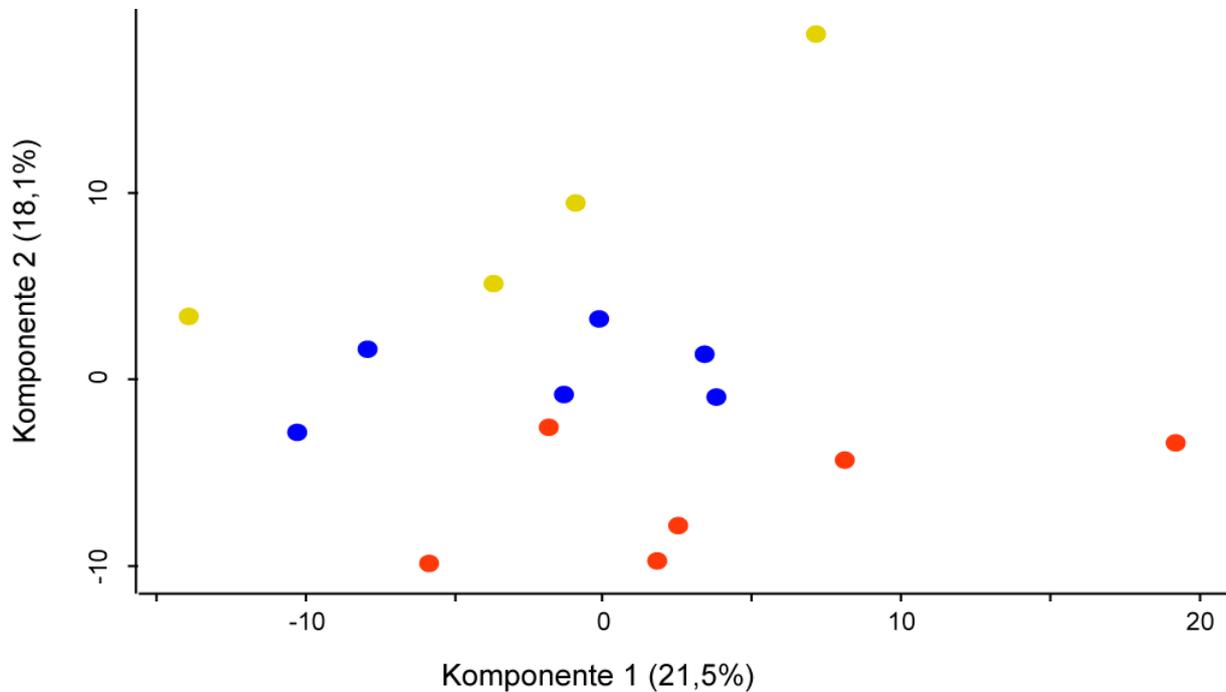


Abb. 4.1: Unterschiede des gesamten RMG-Proteoms in einem diabetischen Zellkulturmodell.

Die Hauptkomponentenanalyse von Replikaten der Kontrollgruppe (gelb, n=4), der Hyperglykämie-Gruppe (blau, n=6) und der Glykolysehemmungs-Gruppe (rot, n=6) zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Behandlungsansätzen entlang der Komponente 2.

4.1.2 Hyperglykämie veränderte die Proteinexpression in ECM-assoziierten Prozessen

In der Hyperglykämie-Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt 464 Proteine signifikant differenziell exprimiert (Abb. 4.2, Protein-Datenpunkte oberhalb der Referenzlinie für $p=0,05$). Davon zeigten 103 Proteine eine mindestens 0,75-fach verminderte bzw. 1,33-fach erhöhte Abundanz (Abb. 4.2, farbige Protein-Datenpunkte links und rechts der Referenzlinien für den Mindestwert der Expressionsänderung).

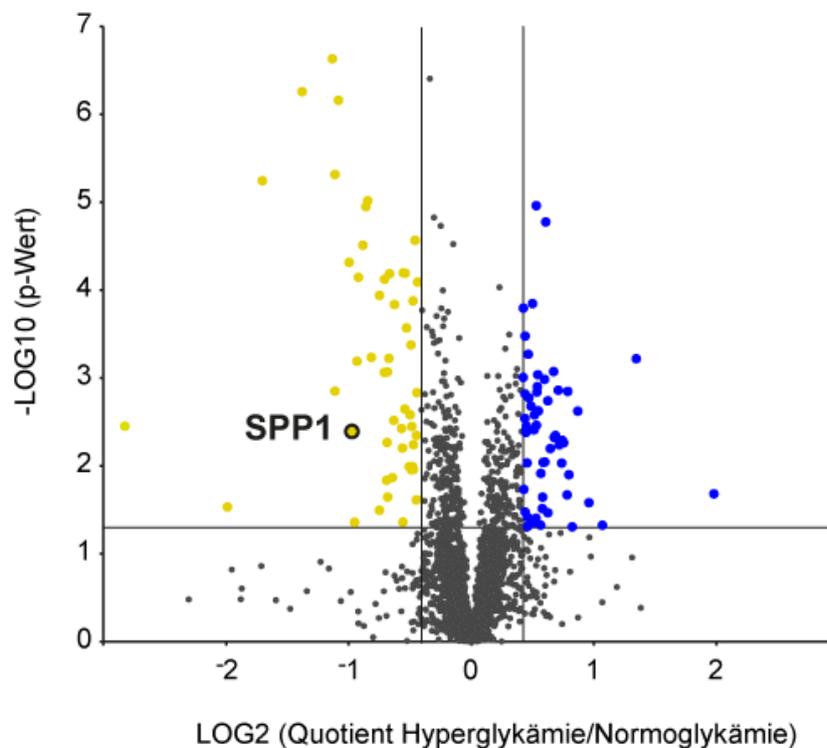


Abb. 4.2: Differenzielle Proteinexpression in der Hyperglykämie-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Vulkanplot der Signifikanzwerte p der Expressionsänderung zwischen der Hyperglykämie-Gruppe und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Expressionsänderung (für alle mit ≥ 2 unigen Peptiden quantifizierten Proteine). Die waagrechte Referenzlinie kennzeichnet einen p -Wert von 0,05, die senkrechten Referenzlinien kennzeichnen eine 0,75-fache bzw. 1,33-fache differenzielle Expression. Signifikant veränderte Proteine, die eine $\leq 0,75$ -fache (gelb) bzw. $\geq 1,33$ -fache (blau) Expressionsänderung erfüllen, sind farblich markiert.

Um herauszufinden, ob die in der Hyperglykämie-Gruppe signifikant veränderten Proteine (103 Proteine aus Abb. 4.2) über einen bestimmten biologischen Prozess miteinander verbunden sind, führten wir eine Pathway-Analyse mit der Genomatix Software durch. Abb. 4.3 zeigt zehn biologische Prozesse, über die ein funktioneller Zusammenhang der eingegebenen Proteine besteht. Dabei sind die Prozesse nach der statistischen Verlässlichkeit, mit der sie erzeugt wurden, sortiert. Die Software legt dabei einen Schwellenwert von 0,01 zugrunde.

Die drei Prozesse mit der höchsten Verlässlichkeit waren: Der Aufbau von Kollagenfasern ("collagen fibril organization"), die ECM-Organisation ("extracellular matrix organization") und die Organisation der extrazellulären Strukturen ("extracellular structure organization"). Die drei relevantesten biologischen Prozesse waren somit mit der ECM assoziiert.

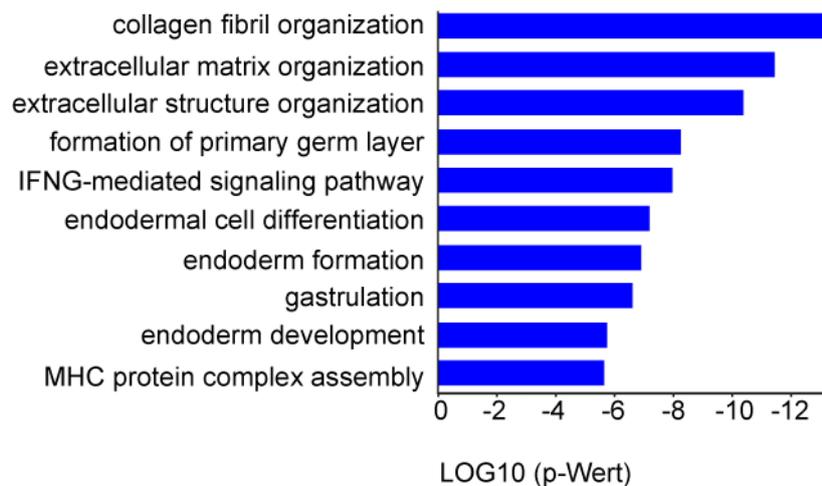


Abb. 4.3: Biologische Prozesse, über die signifikant veränderte Proteine in der Hyperglykämie-Gruppe verbunden sind.

Die drei Prozesse mit der höchsten statistischen Verlässlichkeit sind ECM-assoziert.

4.1.3 Hyperglykämie führte zur verminderten Expression von ECM-Proteinen

Aufgrund der Ergebnisse der Pathway-Analyse (Kapitel 4.1.2) interessierten wir uns als Nächstes speziell für die Veränderung von ECM-Proteinen in der Hyperglykämie-Gruppe und insbesondere in welche Richtung sich diese veränderten.

Unter den 103 differenziell exprimierten Proteinen befanden sich 19 Mitglieder aus der ECM-Proteinfamilie. Die Einordnung als ECM-Mitglied erfolgte mithilfe eines Abgleichs mit der human matrisome database, die im Rahmen des Matrisom-Projekts online frei zur Verfügung steht (<http://matrisomeproject.mit.edu>), (Naba et al. 2016). Diese Datenbank beinhaltet das komplette ECM-Proteom des Menschen und erlaubt außerdem eine Zuordnung in die ECM-Kategorie der strukturellen Kollagene, der Glykoproteine und der Proteoglykane (sogenanntes Kern-Matrisom), (Naba et al. 2016). Darüber hinaus existieren die Kategorien der Regulatorproteine, der sekretierten Faktoren und der ECM-assoziierten Proteine (sogenannte Matrisom-assoziierte Proteine), (Naba et al. 2016).

Die 19 signifikant regulierten ECM-Proteine in der Hyperglykämie-Gruppe sind in Tabelle 4.1 gelistet. Zum Großteil (16 von 19) zeigten die ECM-Proteine eine gegenüber der Kontrollgruppe verminderte Expression (Tabelle 4.1, Ratio $\leq 0,75$). Die Kategorisierung zeigte, dass viele dieser ECM-Proteine strukturelle Komponenten des Kern-Matrisoms, wie Kollagen- α -Ketten, waren. Unter den signifikant verminderten Glykoproteinen waren außerdem Fibronectin und Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1, Osteopontin). Zudem lag das ECM-Regulatorprotein Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase 1 vermindert exprimiert vor.

Ergebnisse

Nr.^A	Proteinname^B	Accession-Nummer^C	ECM-Kategorie^D	Ratio^E
1	Collagen Triple Helix Repeat Containing 1	ENSSSCP00000006461	Glykoprotein	0,31
2	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7	ENSSSCP00000009507	Glykoprotein	0,38
3	Collagen Type 12, alpha 1	ENSSSCP00000004838	Kollagen	0,46
4	Fibronectin 1	ENSSSCP00000017132	Glykoprotein	0,46
5	Collagen Type 5, alpha 1	ENSSSCP00000006161	Kollagen	0,47
6	Collagen Type 3, alpha 1	ENSSSCP00000018631	Kollagen	0,50
7	Syndecan 2	ENSSSCP00000006499	ECM-assoziert	0,55
8	Collagen Type 1, alpha 2	ENSSSCP00000016253	Kollagen	0,56
9	Annexin A8	ENSSSCP00000011058	ECM-assoziert	0,61
10	Secreted Phosphoprotein 1	ENSSSCP00000009825	Glykoprotein	0,62
11	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1	ENSSSCP00000009075	Glykoprotein	0,62
12	Collagen Type 5, alpha 2	ENSSSCP00000016990	Kollagen	0,63
13	Gliomedin	ENSSSCP00000004992	Glykoprotein	0,65
14	Collagen Type 11, alpha 1	ENSSSCP00000007311	Kollagen	0,68
15	Collagen Type 2, alpha 1	ENSSSCP00000027199	Kollagen	0,71
16	Procollagen-Lysine 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1	ENSSSCP00000003724	Regulator	0,73
17	Pregnancy Zone Protein	ENSSSCP00000026195	Regulator	1,44
18	Secreted Frizzled-related Protein 2	ENSSSCP00000009608	Sekretierter Faktor	1,72
19	Lectin Galactoside Binding, soluble, 9	ENSSSCP00000018810	ECM-assoziert	2,54

Tabelle 4.1: Signifikant veränderte ECM-Proteine in der Hyperglykämie-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

Nr. 1-16 zeigen eine $\leq 0,75$ -fach verminderte Expression. Darunter sieben Kollagen- α -Ketten, Fibronectin, SPP1 und Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase 1.

A: Fortlaufende Nummer, B: Name des identifizierten Proteins, C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus der Ensembl Pig database (release 75, Sscrofa10.2, <http://www.ensembl.org>), D: Einordnung als ECM-Mitglied und Kategorisierung anhand der human matrisome database, E: Verhältnis der Abundanz (normalisiert, Mittelwert aus allen Replikaten) des Proteins in der Hyperglykämie-Gruppe und der Kontrollgruppe (Ratio)

4.1.4 Glykolysehemmung veränderte die Proteinexpression in denselben ECM-assoziierten Prozessen

In der Glykolysehemmungs-Gruppe waren verglichen mit der Kontrollgruppe 800 Proteine signifikant differenziell exprimiert (Abb. 4.4, Protein-Datenpunkte oberhalb der Referenzlinie für $p=0,05$). Davon waren 240 Proteine mindestens 0,75-fach vermindert bzw. 1,33-fach erhöht (Abb. 4.4, farbige Protein-Datenpunkte links und rechts der Referenzlinien für den Mindestwert der Expressionsänderung).

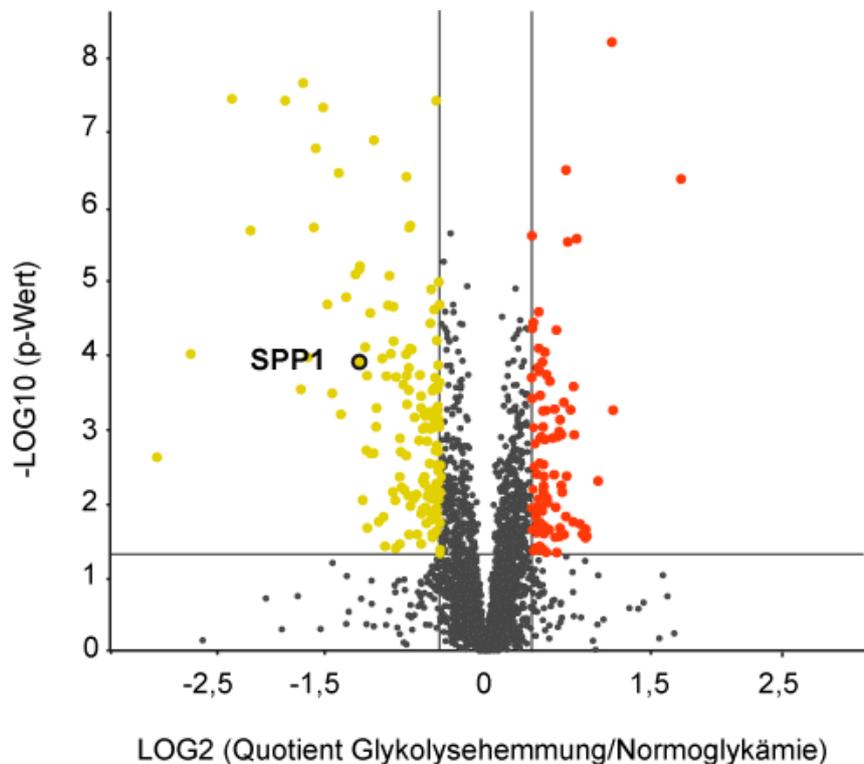


Abb. 4.4: Differenzielle Proteinexpression in der Glykolysehemmungs-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Vulkanplot der Signifikanzwerte p der Expressionsänderung zwischen der Glykolysehemmungs-Gruppe und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Expressionsänderung (für alle mit ≥ 2 unique Peptiden quantifizierte Proteine). Die waagrechte Referenzlinie kennzeichnet einen p -Wert von 0,05, die senkrechten Referenzlinien kennzeichnen eine 0,75-fache bzw. 1,33-fache differenzielle Expression. Signifikant veränderte Proteine, die eine $\leq 0,75$ -fache (gelb) bzw. $\geq 1,33$ -fache (rot) Expressionsänderung erfüllen, sind farblich markiert.

Um auch für alle signifikant veränderten Proteine in der Glykolysehemmungs-Gruppe (240 Proteine aus Abb. 4.4) einen funktionellen Zusammenhang herzustellen, haben wir erneut eine Pathway-Analyse durchgeführt. Abb. 4.5. zeigt zehn biologische Prozesse, über die die eingegebenen Proteine signifikant miteinander in Verbindung stehen.

Die drei Prozesse mit der höchsten Verlässlichkeit waren mit der ECM assoziiert.

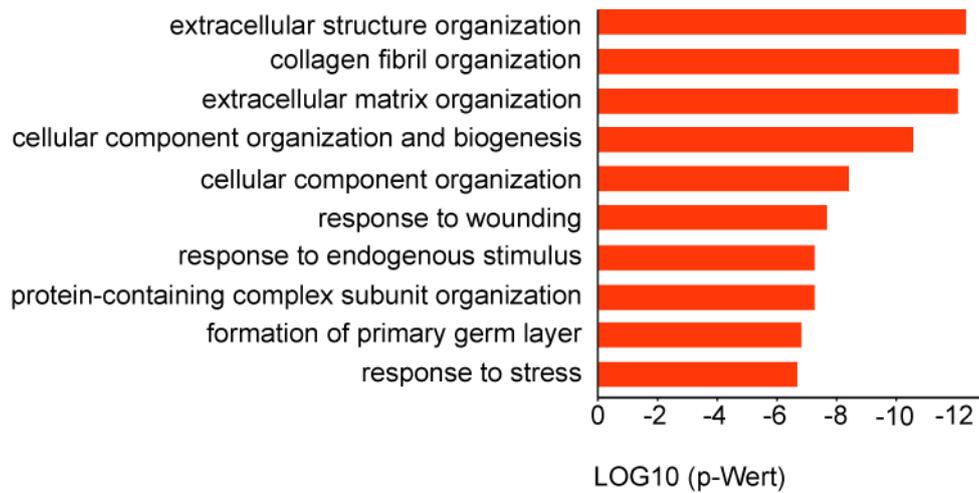


Abb. 4.5: Biologische Prozesse, über die signifikant veränderte Proteine in der Glykolysehemmungs-Gruppe verbunden sind.

Die drei Prozesse mit der höchsten statistischen Verlässlichkeit sind ECM-assoziiert.

4.1.5 Glykolysehemmung führte zur verminderten Expression von ECM-Proteinen

Aufgrund der Ergebnisse der Pathway-Analyse (Kapitel 4.1.4) interessierten wir uns auch in dieser Behandlungsgruppe für die Änderungen speziell der ECM-Proteinfamilie und in welche Richtung sich die ECM-Proteine veränderten.

Unter den 240 Proteinen waren 34 Proteine Mitglieder der ECM. Diese sind in Tabelle 4.2 gelistet. Zum Großteil (28 von 34) zeigten die ECM-Proteine in der Glykolysehemmungs-Gruppe eine gegenüber der Kontrollgruppe verminderte Expression (Tabelle 4.2, Ratio $\leq 0,75$). Die Kategorisierung zeigte auch in dieser Behandlungsgruppe, dass viele der veränderten ECM-Proteine strukturelle Komponenten des Kern-Matrisoms, wie Kollagen- α -Ketten, waren. Unter den signifikant verminderten Glykoproteinen tauchten erneut auch SPP1 und Fibronectin auf. Zudem lagen Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase 1 bis 3, als ECM-Regulatorproteine, vermindert exprimiert vor.

Nr. A	Proteinname^B	Accession- Nummer^C	ECM- Kategorie^D	Ratio^D
1	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7	ENSSSCP 00000009507	Glykoprotein	0,15
2	Fibronectin 1	ENSSSCP 00000017132	Glykoprotein	0,20
3	Collagen Triple Helix Repeat Containing 1	ENSSSCP 00000006461	Glykoprotein	0,22
4	Collagen Type 12, alpha 1	ENSSSCP 00000004838	Kollagen	0,28
5	Collagen Type 5, alpha 1	ENSSSCP 00000006161	Kollagen	0,31
6	Collagen Type 3, alpha 1	ENSSSCP 00000018631	Kollagen	0,33
7	Collagen Type 1, alpha 2	ENSSSCP 00000016253	Kollagen	0,35
8	Syndecan 2	ENSSSCP 00000006499	ECM-assoziiert	0,39
9	Gliomedin	ENSSSCP 00000004992	Glykoprotein	0,43
10	Secreted Phosphoprotein 1	ENSSSCP 00000009825	Glykoprotein	0,44
11	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1	ENSSSCP 00000009075	Glykoprotein	0,45
12	Collagen Type 16, alpha 1	ENSSSCP 00000023415	Kollagen	0,47
13	Collagen Type 5, alpha 2	ENSSSCP 00000016990	Kollagen	0,47
14	Collagen Type 2, alpha 1	ENSSSCP 00000027199	Kollagen	0,49
15	Collagen Type 11, alpha 1	ENSSSCP 00000007311	Kollagen	0,49
16	Cystatin C	ENSSSCP 00000020759	Regulator	0,49
17	Plexin D1	ENSSSCP 00000012355	ECM-assoziiert	0,55
18	Annexin A8	ENSSSCP 00000011058	ECM-assoziiert	0,55

Nr. A	Proteinname^B	Accession- Nummer^C	ECM- Kategorie^D	Ratio^D
19	Osteonectin	ENSSSCP 00000018098	Glykoprotein	0,58
20	Procollagen-Lysine 2- Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1	ENSSSCP 00000003724	Regulator	0,60
21	Complement C1q Chain B	ENSSSCP 00000003829	ECM-assoziiert	0,61
22	Glypican 4	ENSSSCP 00000013478	ECM-assoziiert	0,64
23	Transglutaminase 2	ENSSSCP 00000022472	Regulator	0,64
24	Procollagen-Lysine 2- Oxoglutarate 5-Dioxygenase 3	ENSSSCP 00000020951	Regulator	0,66
25	Cathepsin H	ENSSSCP 00000001934	Regulator	0,66
26	Procollagen-Lysine 2- Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2	ENSSSCP 00000012459	Regulator	0,73
27	Glypican 1	ENSSSCP 00000017338	ECM-assoziiert	0,74
28	Heparan Sulfate Proteoglycan 2	ENSSSCP 00000003814	Proteoglykan	0,75
29	Milk Fat Globule-EGF Factor 8 Protein	ENSSSCP 00000002007	Glykoprotein	1,34
30	Inter-alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 3	ENSSSCP 00000012204	Regulator	1,38
31	Pregnancy Zone Protein	ENSSSCP 00000026195	Regulator	1,76
32	Secreted Frizzled-related Protein 2	ENSSSCP 00000009608	Sekretierter Faktor	1,83
33	Cysteine-rich with EGF-like Domains 2	ENSSSCP 00000001049	Glykoprotein	1,90
34	Thrombospondin 1	ENSSSCP 00000005158	Glykoprotein	3,51

Tabelle 4.2: Signifikant veränderte ECM-Proteine in der Glykolysehemmungs-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

Nr. 1-28 zeigen eine $\leq 0,75$ -fach verminderte Expression. Darunter acht Kollagen- α -Ketten, Fibronektin, SPP1 und Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase 1 bis 3.

A: Fortlaufende Nummer, B: Name des identifizierten Proteins, C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus der Ensembl Pig database (release 75, Sscrofa10.2, <http://www.ensembl.org>), D: Einordnung als ECM-Mitglied und Kategorisierung anhand der human matrisome database, E: Verhältnis der Abundanz (normalisiert, Mittelwert aus allen Replikaten) des Proteins in der Hyperglykämie-Gruppe und der Kontrollgruppe (Ratio)

4.1.6 Hyperglykämie und Glykolysehemmung verminderten die Expression derselben Proteine

In beiden diabetischen Behandlungsgruppen war SPP1 unter den signifikant verminderten Proteinen (Abb. 4.2, 4.4). Wir wollten herausfinden, ob weitere Proteine in beiden Gruppen verändert vorlagen. Dazu verglichen wir alle signifikant differenziell exprimierten Proteine beider Gruppen miteinander.

Wir erhielten 65 Proteine, die sowohl in der Hyperglykämie-Gruppe als auch in der Glykolysehemmungs-Gruppe differenziell exprimiert waren (Abb. 4.6).

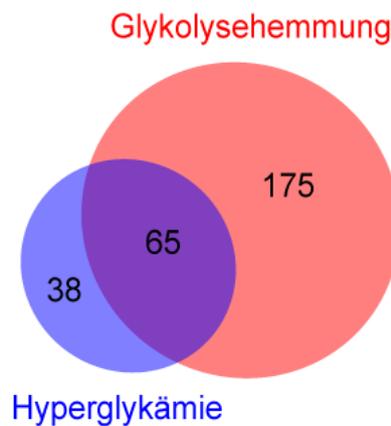


Abb. 4.6: Anzahl an Proteinen (65), die in beiden diabetischen Behandlungsgruppen verändert vorlagen.

Venn Diagramm aller signifikant veränderter Proteine (p -Wert $< 0,05$; $\leq 0,75$ -fache bzw. $\geq 1,33$ -fache differenzielle Expression) in der Hyperglykämie-Gruppe (blau, $n=103$) und der Glykolysehemmungs-Gruppe (rot, $n=240$), verglichen mit der Kontrollgruppe.

4.1.7 Hyperglykämie und Glykolysehemmung verminderten die Expression von SPP1, Kollagen- α -Ketten und Integrin- α -Untereinheiten

Wir wollten als Nächstes die 65 Proteine, die in beiden diabetischen Behandlungsansätzen zu den veränderten Proteinen gehörten (Abb. 4.6), auf ihren funktionellen Zusammenhang hin untersuchen. Dazu wurde mithilfe der Software STRING ein, auf bereits bekannten Daten basierendes, Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk erstellt. Abb. 4.7 zeigt das generierte Netzwerk.

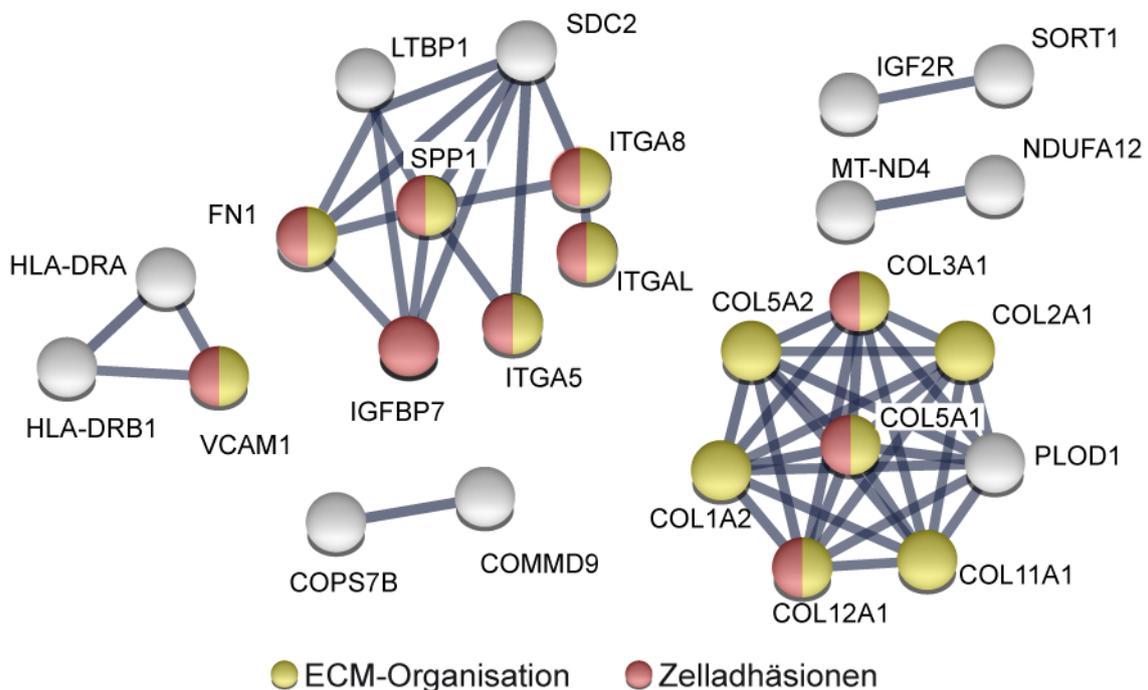


Abb. 4.7: Proteine, die in beiden Behandlungsgruppen verändert vorlagen, interagieren über die ECM-Organisation und über Zelladhäsionsprozesse miteinander.

STRING Netzwerk aller 65 Proteine aus Abb. 4.6. Farblich markierte Protein-Symbole gehören zu den biologischen Prozessen ECM-Organisation (gelb) und Zelladhäsionen (rot).

COL12A1: Collagen Type 12, alpha 1, COL5A1: Collagen Type 5, alpha 1, COL3A1: Collagen Type 3, alpha 1, COL1A2: Collagen Type 1, alpha 2, COL5A2: Collagen Type 5, alpha 2, COL2A1: Collagen Type 2, alpha 1, COL11A1: Collagen Type 11, alpha 1, IGFBP7: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7, FN1: Fibronectin 1, SPP1: Secreted Phosphoprotein 1, ITGA5: Integrin Subunit Alpha 5, ITGA8: Integrin Subunit Alpha 8, ITGAL: Integrin Subunit Alpha L

Besonders auffällig war, dass sieben Kollagen- α -Ketten zur Schnittmenge gehörten. Diese Sieben nahmen eine funktionelle Rolle als interagierende Proteine in der ECM-Organisation ein. Unter den, aus den separierten Analysen bekannten ECM-Proteinen (Kapitel 4.1.2, 4.1.4), tauchten auch Fibronektin und SPP1 wieder auf. Ein neues, funktionelles Cluster ergab sich aus Proteinen, die den Zelladhäsionen zugeordnet wurden. Darunter waren drei Integrin- α -Untereinheiten.

Alle Proteine, die den Zelladhäsionen oder der ECM-Organisation zugeordnet waren, lagen in beiden Gruppen übereinstimmend vermindert exprimiert vor. Insgesamt waren über die Hälfte der 65 Proteine in beiden Gruppen übereinstimmend vermindert exprimiert (39 Proteine). Sie sind in Tabelle 4.3 im Detail dargestellt.

Ergebnisse

Nr.^A	Proteinname^B	Accession- Nummer^C	ECM- Kategorie^D	Zellad- häsion^E	Ratio hg/ng^F	Ratio DG/ng^G
1	Collagen Type 12, alpha 1	ENSSSCP0000004838	Kollagen	Ja	0,46	0,28
2	Collagen Type 5, alpha 1	ENSSSCP0000006161	Kollagen	Ja	0,47	0,31
3	Collagen Type 3, alpha 1	ENSSSCP0000018631	Kollagen	Ja	0,50	0,33
4	Collagen Type 1, alpha 2	ENSSSCP0000016253	Kollagen	n.d.	0,56	0,35
5	Collagen Type 5, alpha 2	ENSSSCP0000016990	Kollagen	n.d.	0,63	0,47
6	Collagen Type 2, alpha 1	ENSSSCP0000027199	Kollagen	n.d.	0,71	0,49
7	Collagen Type 11, alpha 1	ENSSSCP0000007311	Kollagen	n.d.	0,68	0,49
8	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7	ENSSSCP0000009507	Glykoprotein	Ja	0,38	0,15
9	Fibronectin 1	ENSSSCP0000017132	Glykoprotein	Ja	0,46	0,20
10	Gliomedin	ENSSSCP0000004992	Glykoprotein	Ja	0,65	0,43
11	Secreted Phosphoprotein 1	ENSSSCP0000009825	Glykoprotein	Ja	0,62	0,44
12	Collagen Triple Helix Repeat Containing 1	ENSSSCP0000006461	Glykoprotein	n.d.	0,31	0,22
13	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1	ENSSSCP0000009075	Glykoprotein	n.d.	0,62	0,45
14	Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1	ENSSSCP0000003724	Glykoprotein	n.d.	0,73	0,60
15	Syndecan 2	ENSSSCP0000006499	ECM-assoziert	n.d.	0,55	0,39

Ergebnisse

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession- Nummer ^C	ECM- Kategorie ^D	Zellad- häsion ^E	Ratio hg/ng ^F	Ratio DG/ng ^G
16	Annexin A8	ENSSSCP0 0000011058	ECM- assoziiert	n.d.	0,61	0,55
17	Cadherin 6	ENSSSCP0 0000017801	n.d.	Ja	0,72	0,51
18	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1	ENSSSCP0 0000021526	n.d.	Ja	0,72	0,70
19	Fibronectin Type III Domain Containing 3B	ENSSSCP0 0000012523	n.d.	Ja	0,52	0,48
20	Integrin Subunit Alpha 5	ENSSSCP0 0000000308	n.d.	Ja	0,71	0,53
21	Integrin Subunit Alpha 8	ENSSSCP0 0000011782	n.d.	Ja	0,70	0,36
22	Integrin Subunit Alpha L	ENSSSCP0 0000021995	n.d.	Ja	0,69	0,63
23	Delta-like Protein	ENSSSCP0 0000007530	n.d.	Ja	0,57	0,39
24	DnaJ Heat Shock Protein Family Member A4	ENSSSCP0 0000001916	n.d.	n.d.	0,14	0,12
25	Vascular Cell Adhesion Molecule 1	ENSSSCP0 0000007316	n.d.	Ja	0,53	0,37
26	Tissue Factor	ENSSSCP0 0000022354	n.d.	n.d.	0,63	0,44
27	Macrophage Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate	ENSSSCP0 0000003918	n.d.	n.d.	0,64	0,49
28	Insulin Like Growth Factor 2 Receptor	ENSSSCP0 0000004370	n.d.	n.d.	0,52	0,52
29	Tensin 1	ENSSSCP0 0000026158	n.d.	n.d.	0,72	0,53

Ergebnisse

Nr. ^A	Proteinname ^B	Accession- Nummer ^C	ECM- Kategorie ^D	Zellad- häsion ^E	Ratio hg/ng ^F	Ratio DG/ng ^G
30	TSC22 Domain Family, Member 2	ENSSSCP0 0000012480	n.d.	n.d.	0,65	0,54
31	Diacylglycerol Kinase, alpha	ENSSSCP0 0000000387	n.d.	n.d.	0,68	0,56
32	Gap Junction Protein, alpha 1	ENSSSCP0 0000004580	n.d.	n.d.	0,71	0,58
33	Myoferlin	ENSSSCP0 0000011165	n.d.	n.d.	0,71	0,60
34	Family with Sequence Similarity 65, Member A	ENSSSCP0 0000002993	n.d.	n.d.	0,73	0,60
35	Transmembrane 4 L Six Family Member 1	ENSSSCP0 0000012474	n.d.	n.d.	0,69	0,61
36	LIM And Cysteine Rich Domains 1	ENSSSCP0 0000012297	n.d.	n.d.	0,74	0,61
37	Sortilin 1	ENSSSCP0 0000007286	n.d.	n.d.	0,67	0,65
38	Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N- Recognin 4	ENSSSCP0 0000003786	n.d.	n.d.	0,75	0,68
39	Anoctamin 6	ENSSSCP0 0000000856	n.d.	n.d.	0,75	0,70

Tabelle 4.3: Übereinstimmende, signifikant vermindert ($\leq 0,75$ -fach) exprimierte Proteine in beiden diabetischen Behandlungsgruppen.

39 Proteine waren sowohl in der Hyperglykämie-Gruppe (hg) als auch in der Glykolysehemmungs-Gruppe (DG) im Vergleich zur Kontrollgruppe (ng) übereinstimmend vermindert exprimiert. Darunter sieben Kollagen- α -Ketten, die Glykoproteine SPP1 und Fibronectin sowie Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase 1. 14 Proteine gehören außerdem zum biologischen Prozess der Zelladhäsionen, darunter drei Integrin- α -Untereinheiten.

A: Fortlaufende Nummer, B: Name des identifizierten Proteins, C: Identifikationsnummer des identifizierten Proteins aus der Ensembl Pig database (release 75, Sscrofa10.2, <http://www.ensembl.org>), D: Einordnung als ECM-Mitglied und Kategorisierung mithilfe der human matrisome database, n.d.: nicht definiert als ECM Mitglied, E: Übereinstimmung mit der Gene Ontology Bezeichnung des biologischen Prozesses Zelladhäsion, n.d.: nicht definiert als Protein des Zelladhäsion-Prozesses, F: Verhältnis Abundanz (normalisiert, Mittelwert aus allen Replikaten) des Proteins in hg verglichen mit ng (Ratio), G: Verhältnis Abundanz (normalisiert, Mittelwert aus allen Replikaten) des Proteins in DG verglichen mit ng

4.2 Aufbau eines Schweinenetzhautmodells

Um unsere gewonnenen proteomischen Daten verifizieren zu können, wollten wir organotypische Netzhautkulturen aus Schweinen nutzen. Dazu etablierten wir Organkulturen der Schweineretina. Wir profitierten dabei von einem Protokoll unserer Kooperationspartner, die selbst einige Studien über die Kultivierung von retinalen Explantaten aus Schweinen durchgeführt haben (Taylor et al. 2014).

Ziel war es, einen Workflow für Präparation, Kultivierung sowie Fixation und Einbettung zu entwickeln, der praktikabel und reproduzierbar auch von Dritten durchgeführt werden kann. Die Beurteilung über Erfolg oder Misserfolg einer von uns vorgenommenen Modifikation erfolgte einerseits anhand der morphologischen Beurteilung von H&E Färbungen auf Kryoschnitten. Andererseits war ein praktikables, einfaches und reproduzierbares Handling ausschlaggebend für die Entwicklung des Workflows.

Die Entwicklung von Ideen und Lösungen für die unterschiedlichen Komplexe Präparation, Kultivierung und Fixation mit Entwässerung und Einbettung überschneidet sich teilweise, im Folgenden ist die Etablierung zur Vereinfachung in thematisch logischer Reihenfolge präsentiert.

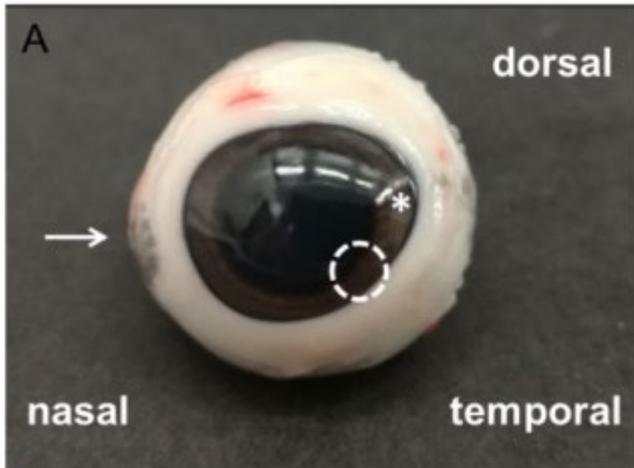
4.2.1 Benennung einzelner Bereiche der Neuroretina

Im Verlauf dieses Projekts entwickelten wir eine Benennung für die Bereiche der Neuroretina des Schweines.

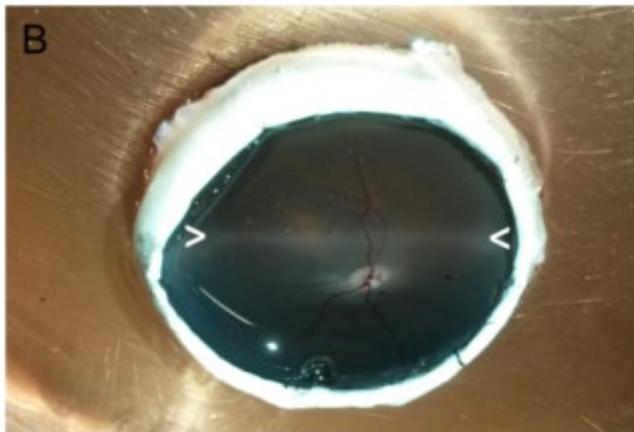
Um sich im eröffneten Auge orientieren zu können ist es erforderlich, am intakten Augapfel zu bestimmen, ob es sich um ein rechtes oder linkes Auge handelt (Abb. 4.8A). Eine ovale Vorwölbung des Bulbus beschreibt den nasalen Pol. Der Limbus ist auf dieser Seite kreisrund, wohingegen er im temporalen Augenwinkel spitz zuläuft. Der Sehnerv liegt etwas ventral des horizontalen Meridians durch den nasalen und temporalen Pol und etwas weiter temporal. Damit lässt sich ein bereits entnommenes Auge eindeutig einer Seite zuordnen. Mithilfe dieser Information ist es im eröffneten Auge möglich, die Lagebeziehungen nasal-temporal und ventral-dorsal zu erkennen und somit gezielt spezifische Bereiche der Neuroretina auszumachen. Parallel zum horizontalen Meridian durch den nasalen und temporalen Pol verläuft durch den Sehnervenkopf und wenige Millimeter dorsal davon ein Band, der sogenannte „visual streak“, das häufig sogar makroskopisch erkennbar ist (Abb. 4.8B). Der visual streak ist eine Struktur welche durch eine hohe Dichte an Zapfen und Ganglienzellen gekennzeichnet ist (E. Vecino et al. 2004; Hendrickson and Hicks 2002). Außerdem gibt es in dieser Region fast keine makroskopisch sichtbaren Blutgefäße (Abb. 4.8B), (Garcá et al. 2005).

Für eine einheitliche Benennung der Regionen innerhalb der Schweineretina haben wir ein gedachtes Raster durch die Retina gelegt (Abb. 4.8C). Die Kleinbuchstaben dienen der Einordnung „zentral“ oder „peripher“, wobei sich diese Einteilung auf die Dichte von Ganglienzellen bezieht (Garcá et al. 2005): (a) dorsal-peripher, (b) zentral (visual streak), (c) ventral-peripher. Die arabischen Zahlen beschreiben die Region in Bezug auf den Sehnervenkopf: (1) distal-nasal, (2) nasal, (3) temporal, Die Region 2b liegt im visual streak in der zentralen Retina nasal des Sehnervenkopfs (Abb. 4.8C).

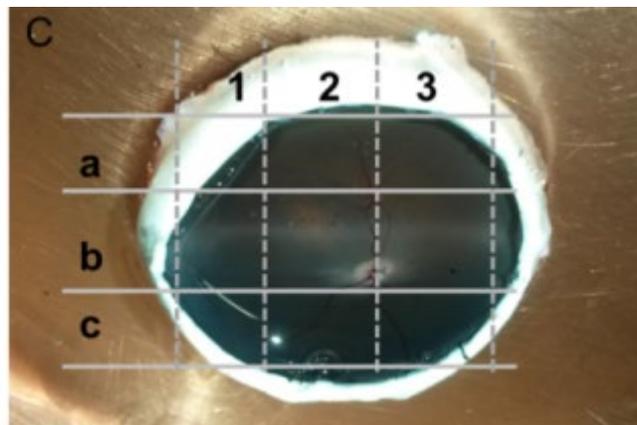
Abb. 4.8: Orientierung an einem linken Schweineauge vor und nach Eröffnung des Augapfels.



(A) Vor Eröffnung des Augapfels, die ovale Vorwölbung des Bulbus befindet sich am nasalen Pol (Pfeil). Im temporalen Augenwinkel läuft der Limbus spitz zu (*). Der Sehnerv liegt etwas ventral und temporal (Kreis).



(B) Nach Eröffnung des Augapfels, dasselbe Auge durch einen Scherenschnitt im Abstand von ca. 3 mm parallel zum Limbus eröffnet. Parallel zum horizontalen Meridian durch den Sehnervenkopf und dorsal davon verläuft der visual streak, zu erkennen an einer dezenten Aufhellung (> <).

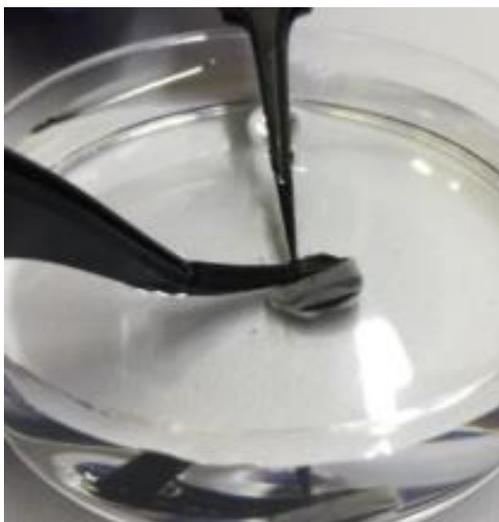


(C) Benennung einzelner Bereiche der Neuroretina, Bereiche liegen (a) dorsal-peripher, (b) zentral, (c) ventral-peripher in der Retina und (1) distal-nasal, (2) nasal, (3) temporal in Bezug auf den Sehnervenkopf.

4.2.2 Erstellung eines Workflows für die Präparation

Die Augen wurden am Schlachthof direkt nach dem Entbluten entnommen, die Präparation war ca. drei Stunden post mortem abgeschlossen. Transport und Lagerung der Augen fand in CO₂ independent Medium auf Eis statt (serumfrei), jedes Auge wurde erst unmittelbar vor der Präparation gereinigt, desinfiziert und durch kreisförmiges Umschneiden des Limbus im Abstand von 3 mm eröffnet. Ein Sehnervenreststück von mindestens 0,5 cm war hilfreich, um das Auge mit einer Pinzette greifen, umkippen und durch sanftes Schütteln den vorderen Teil mitsamt dem Glaskörper entfernen zu können. Danach wurde das Sehnervenreststück abgeschnitten, der verbleibende Augapfel in eine 10 cm Kulturschale gestellt und Augapfel und Schale zügig mit CO₂ independent Medium gefüllt. Die Retina sollte für alle Präparationsschritte immer in ausreichend Medium gehandhabt werden, da ein manipulationsarmes Arbeiten nur schwimmend gewährleistet werden kann. Eine „im Trockenen“ gehandhabte Retina riss sehr leicht und die Ränder ließen sich nicht erkennen. Es war für jeden weiteren Schritt elementar, den Grad der Manipulation so gering wie möglich zu halten, da eine mechanisch beschädigte Retina ein K.-o.-Kriterium für ein gutes Kultivierungsergebnis ist. Daher war es das Ziel, sowohl einen großflächigen, stumpfen Kontakt als auch eine spitze Manipulation der Neuroretina zu vermeiden. Auch das Greifen mit einer Pinzette wurde auf ein Minimum oder auf periphere Bereiche, die nicht als Explantat vorgesehen waren, beschränkt.

Für das Ablösen der Neuroretina vom unterliegenden RPE wurden zwei Techniken verglichen (Abb. 4.13).



Zuerst versuchten wir, das gesamte Teilstück des Auges (Neuroretina mit allen unterliegenden Strukturen, mitsamt Sklera) auszuschneiden und die Neuroretina anschließend durch stupsende Bewegungen mit einer gebogenen Mikropinzette abzulösen (Abb. 4.9). Dies macht allerdings eine starke, stumpfe Manipulation notwendig.

Abb. 4.9: Manipulationsintensives Ablösen der Neuroretina.

Aus diesem Grund entwickelten wir eine alternative Methode, die deutlich weniger Manipulation erforderte. Am intakten, eröffneten Augapfel wurde die Neuroretina

direkt an der Schnittkante mit einer Pinzette vorsichtig vom RPE getrennt. Und zwar nur soweit, bis man mit einer Pipette behutsam Flüssigkeit in den Spalt spülen und so die Neuroretina rundherum ablösen konnte (Abb. 4.10A). Bewährt hat sich dazu eine 1000 µl Pipette mit langsamer (!) Flüssigkeitsabgabe, da die Neuroretina sonst durch den Druck leicht reißen konnte. Gespült wurde so lange, bis nur noch die feste Verbindung zum Sehnervenkopf bestand (Abb. 4.10B). Der gesamte Prozess fand in einer ausreichenden Flüssigkeitsmenge CO₂ independent Medium statt. Für das Ablösen der Neuroretina vom RPE durfte auf keinen Fall FBS im Medium enthalten sein, da sonst die Neuroretina mit dem RPE verklebte und kaum von dieser Schicht abzulösen war.

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, unterscheiden sich die Bereiche der Neuroretina des Schweines hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung. Wir unterschieden zwei Präparationsmethoden (Abb. 4.13): (a) Es wurden wenige Explantate pro Auge gewonnen aber es konnte genau bestimmt werden, aus welcher Lokalisation innerhalb der Neuroretina diese entnommen wurden. (b) Es wurden möglichst viele Explantate pro Auge gewonnen, dabei war allerdings nicht mehr bekannt von welcher Stelle der Neuroretina diese entnommen wurden.

Zu (a): Um ein Explantat mit einer spezifischen Lokalisation (beispielsweise Region 2b aus dem visual streak, Kapitel 4.2.1) zu gewinnen, bewährte es sich, die bis auf den Sehnervenkopf gelöste Neuroretina vorsichtig in ihrer Ausgangsposition im Augapfel zurückzuziehen. So war eine korrekte topographische Orientierung gewährleistet. Anschließend konnte das Explantat präzise aus dem gewünschten Bereich mit einer Stanze ausgestochen werden (Abb. 4.10C). Dabei war darauf zu achten, dass die Neuroretina während des Ausstechens nicht in Falten lag, da sich sonst unregelmäßige Umrisse des Explantats ergaben. Weit peripher gelegene Anteile der Retina konnten im Augapfel durch die Rundung nicht ausgestochen werden. Diese Einschränkungen limitierten die Anzahl der Explantate pro Auge bei dieser Präparationstechnik auf drei Explantate.



Abb. 4.10: Präparation von Explantaten aus einer spezifischen Lokalisation innerhalb der Neuroretina.

(A) Die Neuroretina wird durch Unterspülen mit CO₂ independent Medium vom unterliegenden RPE abgelöst, bis nur noch die feste Verbindung zum Sehnervenkopf besteht. (B) Die Neuroretina wird anschließend in die Ausgangsposition zurückgezogen. (C) Die Explantate können gezielt aus der gewünschten Lokalisation ausgestochen werden, wobei ein Durchstechen der Neuroretina genügt.

Zu (b): Falls eine spezifische Lokalisation des Explantats nicht von Interesse ist, empfehlen wir, die gesamte Neuroretina aus dem Augapfel zu lösen und flach in einer Petrischale auszubreiten. Diese Präparationsmethode ermöglichte die Gewinnung von deutlich mehr, ca. sechs bis zehn Explantaten (je 6 mm Durchmesser) pro Retina. Dazu wurde der Sehnervenkopf mit einer 8 mm Biopsiestanze komplett aus dem Augapfel ausgestochen. Die Neuroretina wurde als breiter „Ring“ aus dem Augapfel separiert. Für das flache Ausbreiten in einer Petrischale war ein Entlastungsschnitt dieses „Rings“ sinnvoll. Mithilfe der Biopsiestanze konnten anschließend möglichst viele Explantate ausgestochen werden (Abb. 4.11A). Die übrige Netzhaut konnte dann einfach abgezogen werden, während die ausgestochenen Explantate an der Petrischale haften blieben (Abb. 4.11B). Die Explantate konnten durch vorsichtiges Spülen leicht vom Untergrund abgelöst werden.

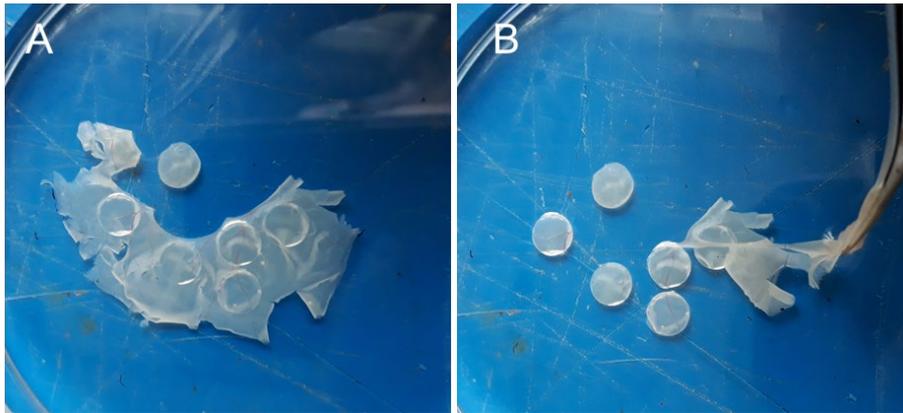


Abb. 4.11: Präparation möglichst vieler Explantate pro Auge ungeachtet der Lokalisation.

(A) Nachdem der Sehnervenkopf ausgestochen wurde, bildet die Neuroretina einen breiten Ring. Dieser kann durchgeschnitten werden, damit die Neuroretina der Petrischale flach anliegt und die Explantate ausgestochen werden können. (B) Anschließend kann der Rest der Neuroretina abgezogen werden, wobei die Explantate am Untergrund haften bleiben.

Für das Ausschneiden der Explantate aus der Neuroretina haben wir das Ausschneiden mit einem Skalpell in eckiger Form mit dem Ausstechen mithilfe einer Biopsiestanze in runder Form verglichen (Abb. 4.13). Das Ausstechen mit einer Biopsiestanze ergab eine kreisrunde Schnittkante. Diese ermöglichte später ein flächendeckendes Anliegen des Explantats auf der Kulturmembran. Eckige Explantate verhakten sich hingegen häufig auf der Membran und die Ecken schlugen sich ein, was teils nicht mehr zu korrigieren war.

Der Transfer des Explantats auf die Kulturmembran war ein kritischer Punkt in der Präparation und wurde daher von uns genauer untersucht (Abb. 4.13). Wir versuchten das Explantat mit Parafilm zu transferieren. Allerdings musste es anschließend entweder kopfüber abgelegt oder heruntergezogen werden. Wir haben daher nach einer Methode gesucht, das Explantat ohne Manipulation mit einer Pipette zu transferieren. Das Ausstechen der Explantate mit einer Biopsiestanze mit einem Durchmesser von 6 mm hat sich dafür als optimal erwiesen. Das ausgestanzte Explantat konnte mit Medium mit dem oberen Ende einer Glaspipette aufgenommen werden, deren unteres verjüngtes Ende abgebrochen und mit einem Glaspipetten Ballon verbunden wurde (Abb. 4.12).

Die Pipette hatte für den Transfer viele Vorteile: Durch das Drehen der Glaspipette konnte das Explantat von allen Seiten makroskopisch auf mechanische

Beschädigungen überprüft werden. In der Glaspipette war es zudem sehr einfach möglich, die innere Oberfläche der Netzhaut (liegt *in vivo* dem Glaskörper an) von der äußeren Oberfläche (Photorezeptoren, die *in vivo* dem RPE anliegen) zu unterscheiden. Die innere Oberfläche der Netzhaut erschien glatt und glänzend. Makroskopisch sichtbare Blutgefäße waren aufgrund des oberflächennahen Verlaufs sehr deutlich abgrenzbar und leuchtend hell-rot gefärbt. Außerdem rollte sich das Explantat immer über diese Oberfläche ein (Abb. 4.12A). Die äußere Oberfläche erschien matt, samtig und stumpf und die Blutgefäße waren verwaschen (Abb. 4.12B).

Für das Ablegen der Explantate auf der Kulturmembran musste entschieden werden, welche Oberfläche des Explantats während der Kultivierung der Kulturmembran aufliegen sollte (im Folgenden „Ausrichtung“ genannt). In der Pipette konnte das Explantat durch Drehen und sanftes Auf- und Abpipettieren in die, für die gewünschte Ausrichtung passende, Position für den Ablegevorgang gebracht werden. Anschließend wurde abgewartet, bis die festgelegte Unterseite des Explantats bis zum Ende der Glaspipette abgesunken war (Abb. 4.12C).

Das Ablegen des Explantats in korrekter Ausrichtung auf der Membran erforderte einiges Geschick und viel Übung. Dabei sollte es nicht zum Einschlagen von Randbereichen kommen. Bewährt hat sich das Ablegen in einem Tropfen Medium (Abb. 4.12D). Dieser konnte anschließend mit einer Pipettenspitze vorsichtig abgezogen werden, wodurch das Explantat sauber ausgebreitet zum Liegen kam (Abb. 4.12E). Es war möglich, auf diese Weise bis zu drei Explantate pro Insert abzulegen.

Falls es nicht auf Anhieb gelang, das Explantat ohne Einschlagen bzw. in der richtigen Ausrichtung abzulegen, sind wir wie folgt vorgegangen: Das Insert wurde mit ca. 2 ml Medium aufgefüllt und das schwimmende Explantat anschließend mit einer gebogenen Mikropipette in die gewünschte Position gebracht. Das komplette Medium musste dann wieder abgesaugt werden. Limitierend bei dieser Methode war allerdings, dass eventuell zuvor in dasselbe Insert abgelegte Explantate durch die Mediumzugabe wieder aufschwammen.

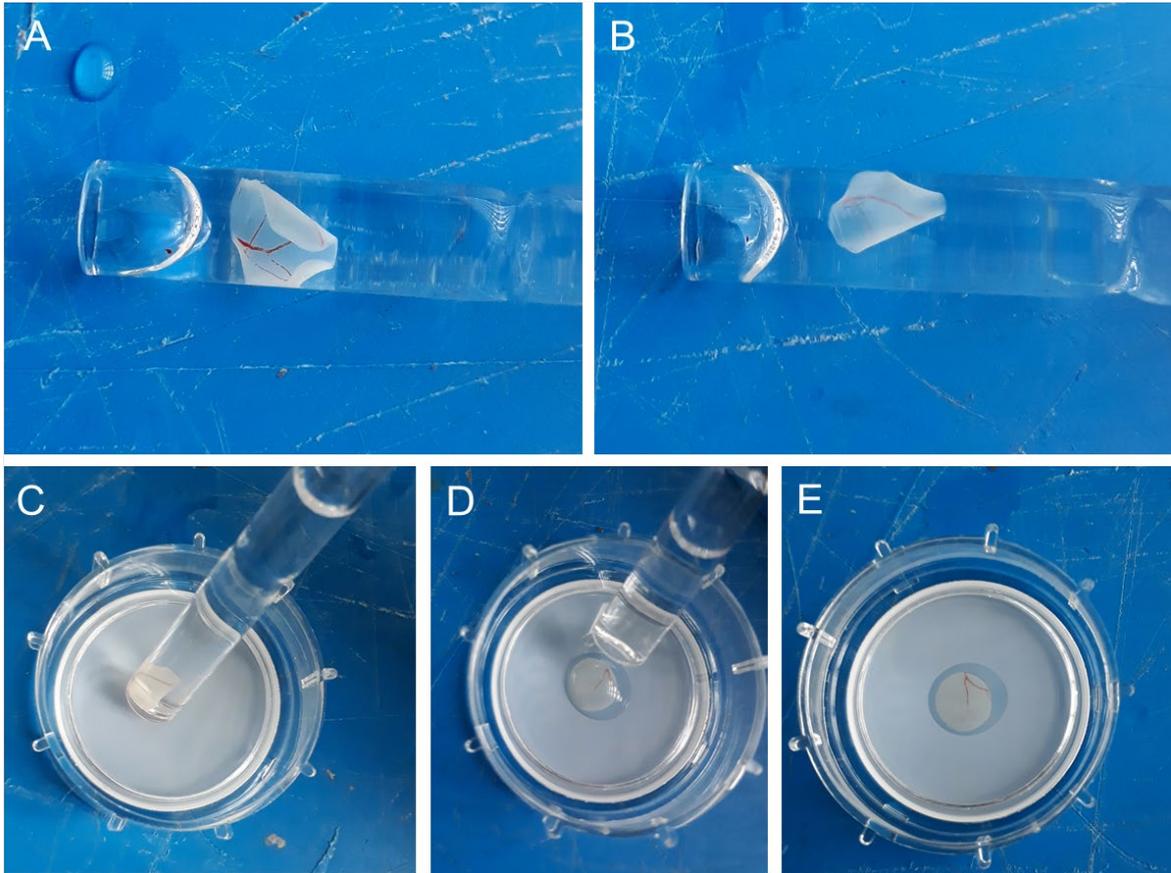


Abb. 4.12: Transfer und Ablegen eines Explantats mithilfe einer Glaspipette.

(A) Zu sehen ist die innere Oberfläche der Neuroretina (zeigt zum Betrachter). Das ist an der markanten Darstellung der Blutgefäße erkennbar sowie am Einrollen über diese Fläche. (B) Dasselbe Explantat „auf die Rückseite“ gedreht. Zu sehen ist die matte, samtige äußere Oberfläche mit den Photorezeptoren. Die Blutgefäße sind verwaschen. (C) Absinken der gewünschten Unterseite (welche auf der Kulturmembran aufliegen wird) bis ans Ende der Glaspipette. (D) Ablegen des Explantats in einem Tropfen Medium. (E) Nach dem Absaugen des Tropfens liegt das Explantat der Membran flach an.

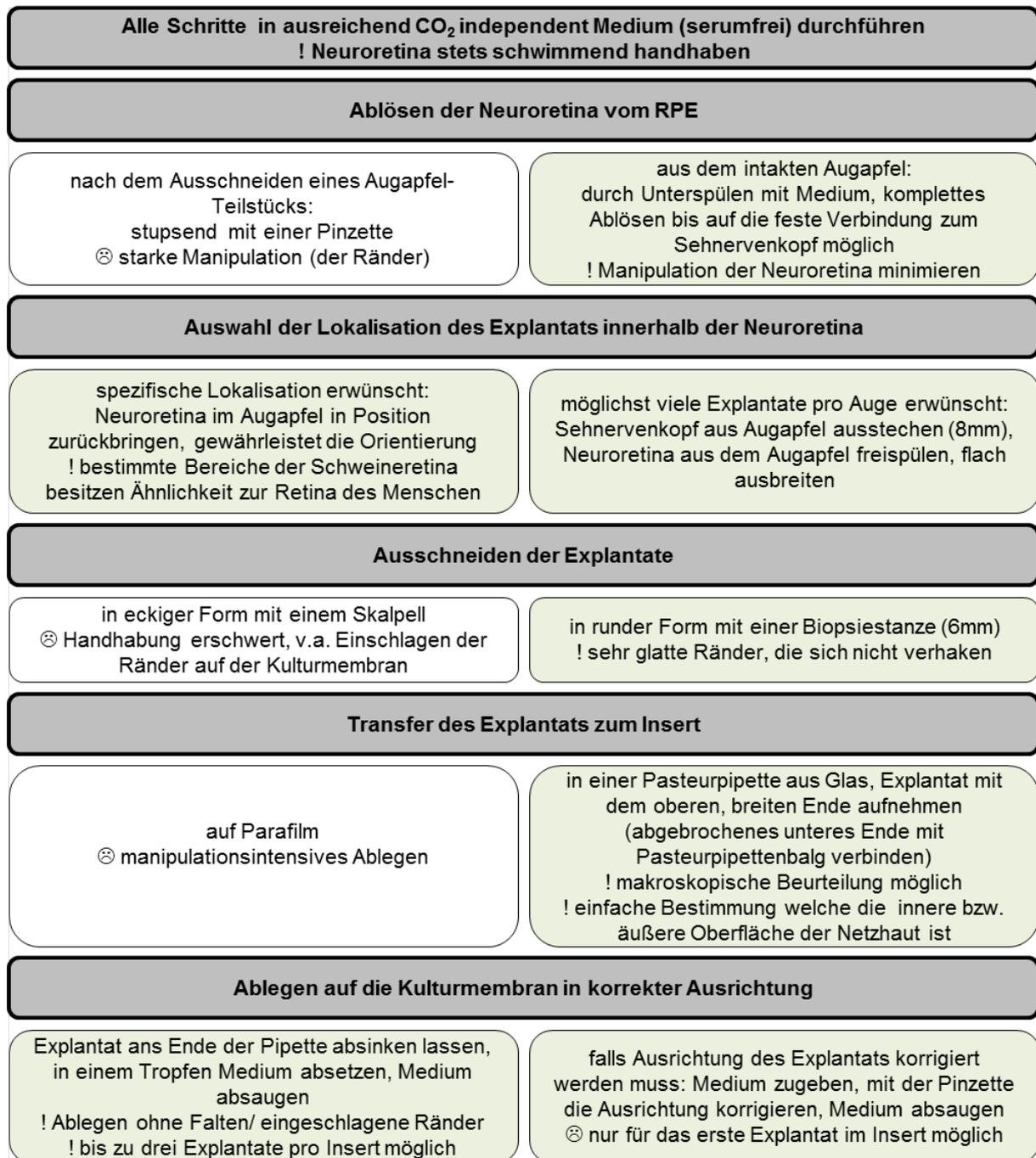


Abb. 4.13: Workflow für die Präparation von Explantaten.

Die grauen Kästen beschreiben die Arbeitsschritte des Protokolls, die Kästen dazwischen die Art der Durchführung dieser Arbeitsschritte. Alternativ getestete Methoden sind dabei gegenübergestellt. Die von uns übernommene Ausführung ist jeweils grün dargestellt, teilweise sind beide Methoden möglich/nötig. Mit „!“ ist gekennzeichnet, was mit der jeweiligen Methode erreicht/erleichtert werden soll. Die mit dem „⊗“-Symbol markierten Nachteile begründen eine Ablehnung der Methode (transparente Kästen) bzw. deren Nachteile.

4.2.3 Die morphologische Struktur als Beurteilungskriterium

Um im weiteren Verlauf den Erfolg oder Misserfolg der Kultivierung und Fixation von Explantaten beurteilen zu können, haben wir den Erhalt der morphologischen Struktur der Neuroretina als Beurteilungskriterium verwendet.

Die Beurteilung erfolgte anhand von H&E Färbungen auf Kryoschnitten. Im Detail haben wir folgende Strukturen berücksichtigt (Abb. 4.14):

(a) Definierbarkeit der einzelnen Netzhautschichten, (b) Erhalt der Photorezeptor-Außensegmente, (c) Vorhandensein von horizontalen „Zusammenhangstrennungen“ sowie Löchern oder Rissen, (d) Dichte der Zellkerne in den Kernschichten.

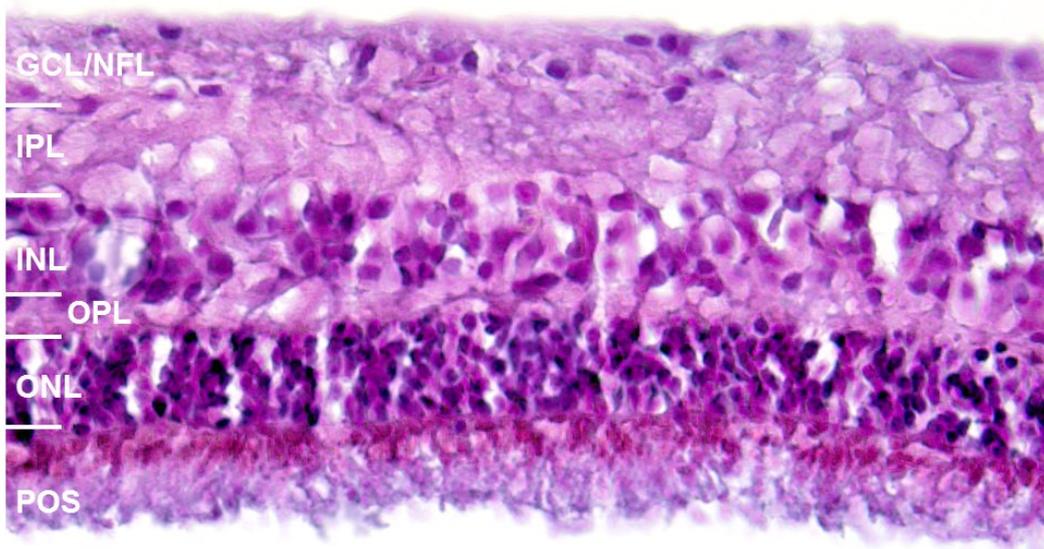


Abb. 4.14: Kriterien für die Beurteilung der morphologischen Struktur anhand einer H&E Färbung auf einem Kryoschnitt, 400-fache Vergrößerung.

Beispiel Explantat nach drei Tagen in Kultur: Alle Schichten der Neuroretina sind definierbar und zusammenhängend. Die Photorezeptor-Außensegmente sind vollständig erhalten. Die Zellkerne in der äußeren Kernschicht sind dicht gepackt, in der inneren Kernschicht ist eine geringgradig verminderte Dichte an Zellkernen sichtbar.

NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, POS: Photorezeptor-Außensegmente

4.2.4 Serum als limitierender Zusatz im RPMI 1640 Kulturmedium

Im Rahmen der Überlegungen, welche Art der Kultivierung zum besten Ergebnis führt, haben wir einige Modifikationen verglichen. Im Speziellen haben wir die Ausrichtung der Neuroretina auf der Kulturmembran, die Auswirkung verschiedener Kulturmedien mit und ohne Serumzusatz sowie die Ko-Kultivierung mit anderen Netzhautzellen untersucht. Die Auswertung erfolgte durch die Beurteilung der morphologischen Struktur von H&E Färbungen auf Kryoschnitten (Kapitel 4.2.3). Unberücksichtigt blieb, aus welchem Bereich der Schweineneuroretina die Explantate entnommen wurden. Pro Modifikation wurden mindestens drei Explantate untersucht. Die Kultivierungsdauer in den einzelnen Versuchen war für die jeweils miteinander zu vergleichenden Modifikationen identisch und betrug zwei bis vier Tage. Ein Mediumwechsel erfolgte stets nach 48 Stunden. Das Protokoll für Präparation sowie Fixation, Entwässerung und Einbettung war jeweils identisch.

Hinsichtlich der Ausrichtung der Explantate auf der Kulturmembran konnten wir nach drei Tagen in Kultur keine morphologischen Unterschiede feststellen (Abb. 4.16). Wir haben Explantate in der IRS-Ausrichtung (die innere Oberfläche liegt auf der Kulturmembran) mit solchen in der STD-Ausrichtung (die äußere Oberfläche mit den Photorezeptoren liegt auf der Kulturmembran) verglichen (n=4 pro Gruppe). Für die Beurteilung aller nachfolgenden Versuche, inklusive der aus Kapitel 4.3 und 4.4, wurde ausschließlich die IRS-Ausrichtung angewandt.

Für die Auswahl des am besten geeigneten Kulturmediums wurden drei verschiedene Medien getestet: RPMI 1640, DMEM/F12 und Neurobasalmedium, jeweils unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin-Streptomycin (Abb. 4.16). Die Unterschiede beim Erhalt der Photorezeptor-Außensegmente waren nach zwei Tagen in Kultur deutlich (n=3 pro Medium). Mit DMEM/F12 kam es zu Verklebungen im Bereich der Photorezeptor-Außensegmente (Abb. 4.15A). Die Kultivierung mit Neurobasalmedium führte im Vergleich zu den anderen beiden Medien häufiger zum Verlust der Außensegmente (Abb. 4.15B). Die am besten erhaltene Morphologie der gesamten retinalen Architektur zeigten Explantate, die mit RPMI 1640 Medium kultiviert wurden (Abb. 4.15C). Alle folgenden Experimente wurden daher unter Verwendung von RPMI 1640 Medium durchgeführt.

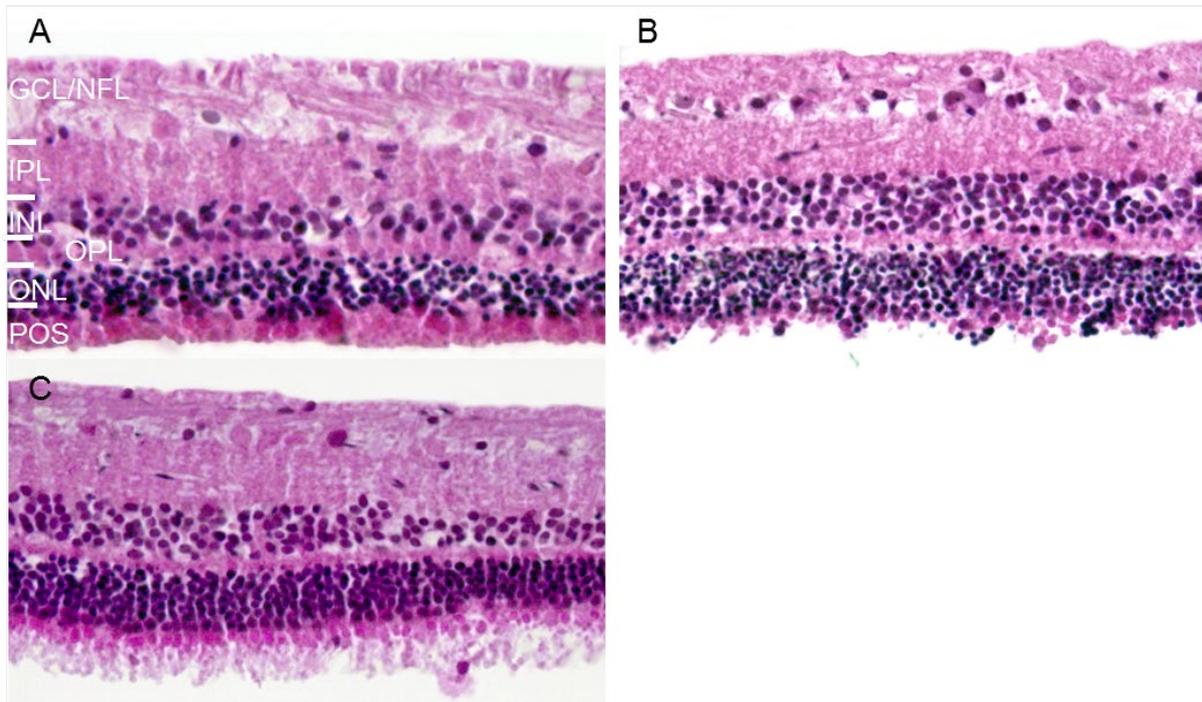


Abb. 4.15: Auswirkung verschiedener Kulturmedien auf die morphologische Struktur in H&E Färbungen nach 48 Stunden *in vitro*, repräsentative Bildauswahl (n=3 Explantate pro Medium), 400-fache Vergrößerung.

Unterschiede betreffen vor allem die Photorezeptor-Außensegmente. (A) Kultivierung mit DMEM/F12 führt zu Verklebungen der Photorezeptor-Außensegmente. (B) Kultivierung mit Neurobasalmedium führt zu großflächigem Verlust der Photorezeptor-Außensegmente. (C) Durch Kultivierung mit RPMI 1640 konnte das beste Ergebnis hinsichtlich dem Erhalt der Photorezeptor-Außensegmente und der gesamten Netzhautmorphologie erzielt werden.

NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, POS: Photorezeptor-Außensegmente

Um die Notwendigkeit der Zugabe von FBS in das RPMI 1640 Medium zu testen, haben wir die Kultivierung mit 10% FBS bzw. ohne FBS bei je einer Gruppe von Explantaten (n=5 pro Gruppe) verglichen (Abb. 4.16). In der Gruppe ohne FBS löste sich die morphologische Struktur großflächig auf (Bilder nicht gezeigt). Auf eine serumfreie Kultivierung haben wir daher in allen weiteren Experimenten verzichtet.

Zuletzt haben wir die Auswirkung einer Ko-Kultivierung mit RMG und RPE im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht (n=3 pro Gruppe), (Abb. 4.16). Primäre RMG und RPE wurden jeweils sieben Tage vorher aus Schweineaugen isoliert und in RPMI 1640 Medium in six well Platten kultiviert. An dem Tag an dem die Explantate präpariert wurden hatten die Zellen eine Konfluenz von 50% (RMG) bzw. 100% (RPE) erreicht. Die Zellen wurden in den six well Platten belassen, das Medium erneuert und die Inserts mit den Explantaten eingestellt. Nach vier Tagen *in vitro* gab es keine Unterschiede beim Erhalt der morphologischen Struktur der Explantate (Bilder nicht gezeigt). Für alle weiteren Experimente wurde die Ko-Kultur nicht angewandt, da der Zeit- und Ressourcenaufwand erheblich ist. Da aus morphologischer Sicht nichts gegen die Ko-Kultur mit anderen Zellen sprach, kann diese für bestimmte Fragestellung gegebenenfalls trotzdem angewendet werden.

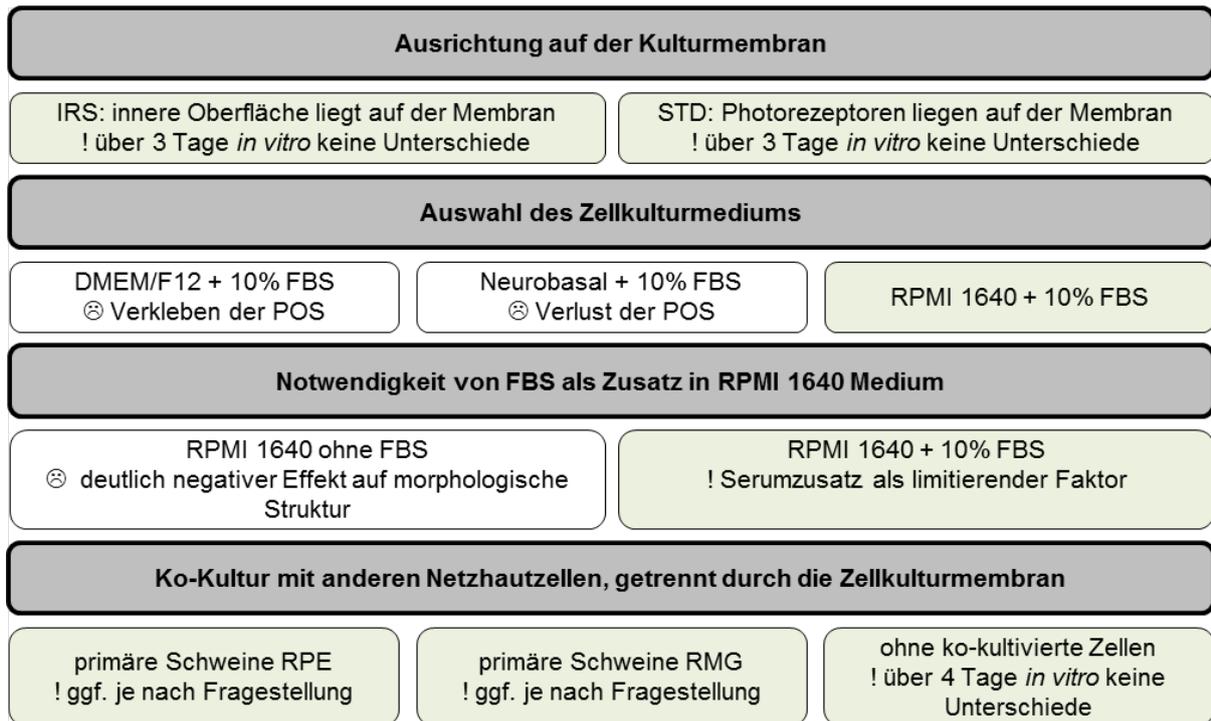


Abb. 4.16: Modifikationen bei der Kultivierung von Explantaten.

Die grauen Kästen beschreiben verschiedene Überlegungen zu den Modifikationen, die Kästen dazwischen geben Details an. Alternativ getestete Modifikationen sind dabei gegenübergestellt. Falls von uns übernommen, sind die betreffenden Modifikationen grün dargestellt, teilweise sind alle möglich. Mit „!“ ist gekennzeichnet, was mit der jeweiligen Modifikation erreicht wird. Die mit dem „⊗“-Symbol markierten Nachteile begründen eine Ablehnung der Modifikation (transparente Kästen).

IRS: *engl.* inner retinal support, STD: Standard-Ausrichtung, POS: Photorezeptor-Außensegmente, RMG: Müller Gliazellen, RPE: Pigmentepithel, FBS: Fötales Kälberserum

4.2.5 Fixation und Einbettung mitsamt der Kulturmembran

Zu Beginn der Etablierung von Schweinenetzhautexplantaten in unserem Labor standen wir vor dem Problem, dass trotz Einhaltung des uns zur Verfügung gestellten Protokolls eine Kultivierung von 48 Stunden zu einem morphologisch völlig zerstörten Erscheinungsbild in H&E Färbungen auf Kryoschnitten führte (Abb. 4.17A). Die Auflösung der Struktur über die komplette Fläche des Explantats konnte durch jeden der erfolgten Arbeitsschritte (Fixation, Präparation, Kultivierung) verursacht worden sein.

Wir konzentrierten uns zuerst auf die Fixationstechnik, wobei der Angriffspunkt des Fixanz ausgetestet wurde (Abb. 4.20). Die Kultivierungsdauer von 48 Stunden, das Fixanz Paraformaldehyd (PFA) 4% und die Fixationsdauer von drei Stunden bei 4 °C behielten wir während dieses Prozesses konstant bei. Zu Beginn benetzten wir ausschließlich die Explantatoberfläche mit PFA und erhielten ein morphologisch völlig zerstörtes Erscheinungsbild (Abb. 4.17A). Durch die zusätzliche Fixation von unterhalb der Kulturmembran konnten wir das Ergebnis hinsichtlich der Morphologie in H&E Färbungen bereits deutlich verbessern (Abb. 4.17B). Anschließend versuchten wir die Explantatoberfläche nicht nur zu benetzen, sondern komplett mit PFA zu bedecken und erzielten so das beste Ergebnis (Abb. 4.17 C). Die Fixationstechnik stellte sich damit als ein limitierender Faktor für den Erhalt der morphologischen Struktur heraus.

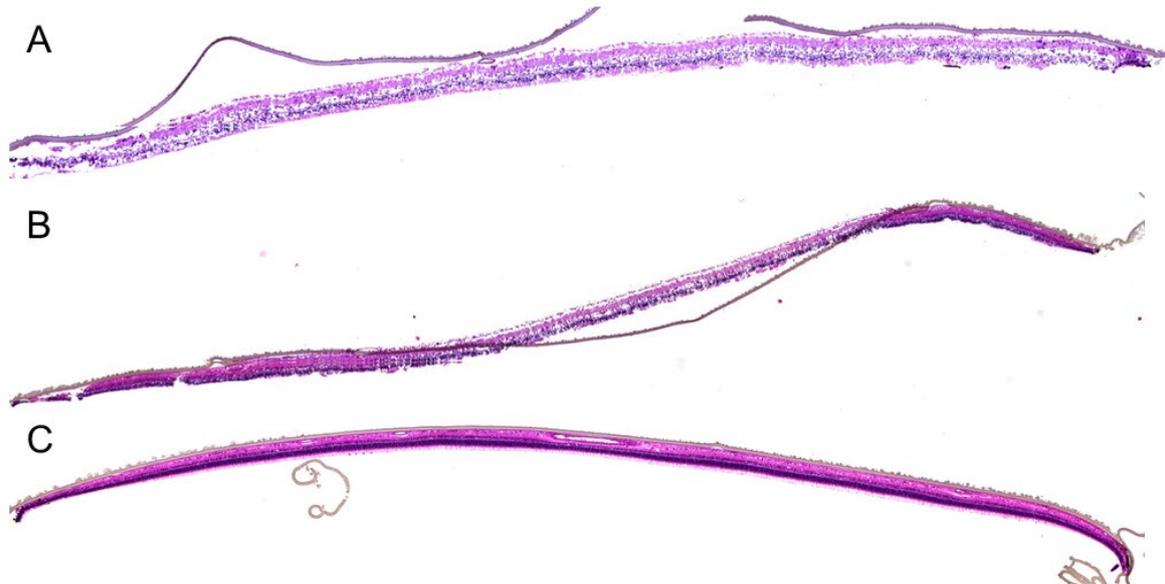


Abb. 4.17: Vergleich verschiedener Fixationstechniken zum Erhalt der morphologischen Struktur in H&E Färbungen nach 48 Stunden *in vitro*, 100-fache Vergrößerung, Rasteraufnahme.

(A) Als Ausgangspunkt stand die zerstörte Struktur nach Fixation durch Benetzen der Explantatoberfläche mit PFA 4%. (B) Das Benetzen der Oberfläche und darüber hinaus die Fixation von unterhalb der Kulturmembran verbesserte die Struktur in den Randbereichen deutlich. (C) Vollständiges Bedecken der Explantatoberfläche mit PFA und zusätzliche Fixation von unterhalb der Membran stabilisierten das morphologische Ergebnis über die gesamte Breite des Schnitts.

Nachdem wir bei der Morphologie von Explantaten nach 48 Stunden *in vitro* ein befriedigendes Ergebnis erzielt hatten, widmeten wir uns der Entwicklung eines Protokolls für die Fixation, Entwässerung und Einbettung. Mit diesem Protokoll wollten wir ein einfaches und praktikables Vorgehen bei der Erstellung von Netzhautschnitten für bildgebende Verfahren erreichen.

Das erste Problem ergab sich durch das vollständige Bedecken der Explantate während der Fixation, weil sich die Explantate dadurch von der Kulturmembran ablösten. Dies führte dazu, dass sich die losgelösten Explantate massiv einrollten, was auch durch intensive Bemühungen und Manipulation kaum rückgängig zu machen war. Folglich entstanden stark eingerollte Schnitte für die mikroskopische Beurteilung. Diese waren am Mikroskop schwer zu fotografieren und hafteten während des Färbens schlechter am Objektträger. Da der Versuch des Entrollens immer zu unnötiger Manipulation führte, suchten wir einen Weg, die Explantate möglichst lang auf der im Insert aufgespannten Kulturmembran anhaften zu lassen.

Dies wurde durch eine Anpassung bei der PFA-Zugabe erreicht (Abb. 4.20). Indem wir die Explantate nicht auf einmal vollständig bedeckten, sondern über eine Zeitdauer von mindestens fünf Minuten tropfenweise mit PFA benetzten bis sie letztendlich vollständig bedeckt waren, konnten wir ein Ablösen verhindern.

Das Protokoll sah anschließend das Waschen der Explantate sowie die Inkubation in Phosphatpuffer (PB) bei Raumtemperatur vor (Abb. 4.20). Zuerst wurde das PFA aus dem Insert und aus der Platte abgesaugt und die Platte sorgfältig von PFA Rückständen gereinigt. Dann wurden die Explantate durch dreimaliges, vorsichtiges Ausspülen des Inserts von innen mit ca. 2 ml PB gewaschen. Dabei wurde penibel darauf geachtet, dass sich die Explantate nicht von der Membran lösten. Anschließend wurden die Explantate mit 2 ml PB bedeckt und vier Stunden in PB belassen.

Die anschließende Entwässerung in aufsteigender Sucroslösung (15% bzw. 30% in PB) führte zur nächsten Problematik. Durch Zugabe der Sucroslösung auf die Explantate „schrumpelten“ diese zusammen und lösten sich daher erneut von der Membran, woraufhin sie sich wieder einrollten (Abb. 4.20). Dies konnte verhindert werden, indem die Explantate mitsamt der Membran noch vor dem Entwässern mithilfe einer Biopsiestanze ausgestochen und in eine sehr flache Biopsiekapsel gelegt wurden (Abb. 4.19A). In den Kapseln konnte die Entwässerung durchgeführt werden ohne dass es zum Ablösen von der Membran und damit zum Einrollen kam (Abb. 4.20). Die Membran erwies sich außerdem als praktisch, da sie bei der weiteren Handhabung als Haltepunkt für die Pinzette diente, ohne dass das Explantat selbst manipuliert werden musste. Daher wurde zum Ausstechen eine Biopsiestanze mit größerem Radius (8 mm) als das Explantat (6 mm) gewählt.

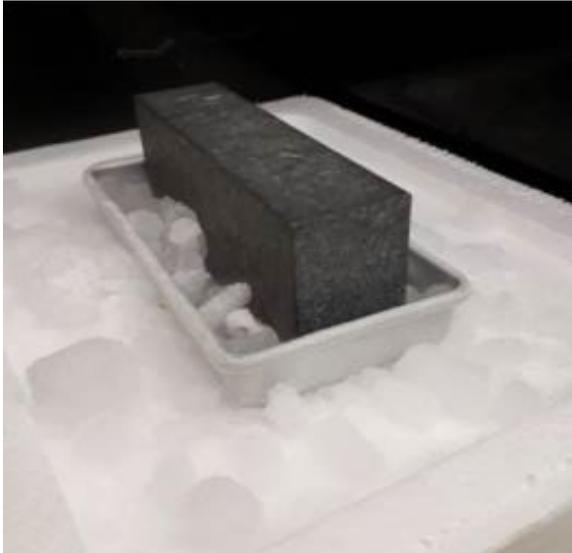


Abb. 4.18: Konstruktion zum Schockgefrieren.

Für den anschließenden Arbeitsschritt des Einbettens entschieden wir uns aufgrund der Reproduzierbarkeit und Einfachheit für gebrauchsfertiges OCT-Einbettmedium anstatt einer selbst angefertigten Mischung aus Ei-Albumin und Gelatine. Um ein Schockgefrieren des OCT-Blocks in flüssigem Stickstoff nachzubilden, wurde eine Konstruktion aus einem Metallblock verwendet. Dieser kühlt sich durch das Einstellen in eine Mischung aus Ethanol und Trockeneis

auf ca. -72 °C ab (Abb. 4.18). Das Gefrieren des OCT-Blocks erfolgte auf der Metallblockoberfläche.

Zuerst versuchten wir die Explantate in einem „frei Hand“ abgelegten OCT-Tropfen einzubetten. Der OCT-Tropfen froh jedoch auf dem Metallblock so schnell durch, dass die Positionierung des Explantats im Tropfen kaum möglich war. Schaffte man es nicht, das Explantat vor dem Durchfrieren des Tropfens mit ausreichend OCT zu überschichten, kam es zu Gefrierschäden. Als Alternative verwendeten wir Einbettformen (Abb. 4.19B, 4.20). In der Form konnte das Explantat ganz ohne Zeitdruck korrekt in OCT positioniert und komplett bedeckt werden ehe die Form dann auf den Block gestellt wurde. Das Durchfrieren des OCT-Blocks in der Einbettform dauert zwar verhältnismäßig länger, wir konnten allerdings keine negativen Konsequenzen dieser Methode feststellen.

Das Explantat musste in der Einbettform im OCT möglichst genau parallel zum Einbettform-Boden positioniert werden, da das Explantat nur so zuverlässig im 90° Winkel auf den Probenhalter des Kryostats befestigt werden konnte (gefrorenes OCT ist undurchsichtig, sodass man das Explantat im fertigen OCT-Block nicht mehr sah und sich auf die äußere Form des Blocks verlassen musste). Der 90° Winkel stellte beim Schneiden einen möglichst gleichmäßigen Querschnitt durch alle Schichten der Netzhaut sicher, was wir als Qualitätskriterium für die Netzhautschnitte voraussetzten. Die schon zuvor bewährte Methode, Explantate dauerhaft auf der Kulturmembran anhaftend zu handhaben, erwies sich erneut als elementar wichtig

um dieses Qualitätskriterium zu erreichen (Abb. 4.20). Auf der Membran anhaftende Explantate konnten sehr einfach parallel zum Einbettform-Boden positioniert werden. Demgegenüber konnten von der Membran abgelöste Explantate weder flach ausgebreitet, noch parallel zur Unterlage eingebettet werden.

Wichtig war dabei jedoch, dass die Membran im Verhältnis zur Einbettform nicht zu groß war. Eine zu große Membran wirkte wie eine „Trennschicht“ im OCT-Block und das führte zum Auseinanderbrechen des Blocks beim Schneiden. Bewährt hat sich eine Einbettform von 8 x 12 mm Größe (Breite x Länge) und ein Durchmesser von 8 mm der Explantat-Membran-Kombination (Abb. 4.19B). Dabei war immer noch ein ausreichender Überstand der Membran im Vergleich zum Explantat gewährleistet, um beim Einbetten die Membran als Haltepunkt für die Pinzette zu nutzen. Markierungen auf der Form halfen später beim Schneiden, wenn die Schnittkante des Blocks ausgewählt wurde.

Nach dem Gefrieren wurde der OCT-Block mit einem Streifen Parafilm luftdicht umwickelt und bei -20 °C aufbewahrt. Der quaderförmige Block konnte sehr praktikabel am Probenhalter des Kryostats aufgestellt und festgefroren werden. Die Membran ließ sich am Kryostat einfach mitschneiden (Abb. 4.19C). Beim Färben war allerdings zu beachten, dass sich die Membran leicht vom Objektträger löste und sich teilweise über den Schnitt legte. Diese Abschnitte der Retina konnten am Mikroskop nicht ausgewertet werden. Es empfahl sich daher, gelöste Membranfäden während des Färbens kontrolliert mit einer Pinzette vom Schnitt zu entfernen. Dies war am besten bei kompletter Benetzung des Schnittes mit Waschpuffer zu bewerkstelligen.

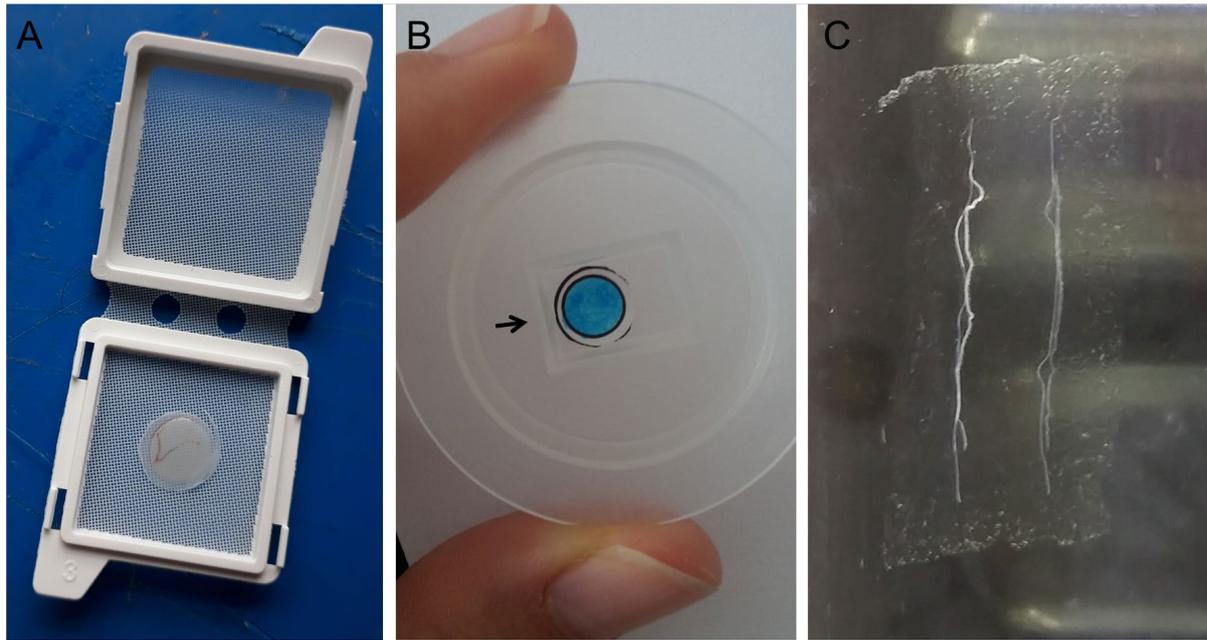


Abb. 4.19: Die Arbeitsschritte ab der Entwässerung über das Einbetten und Schneiden erfolgten mit dem auf der Kulturmembran anhaftenden Explantat.

(A) Das Explantat wurde mitsamt der Membran ausgestochen und in einer flachen Biopsiekapsel entwässert. Ein leichtes Überstehen der Membran erleichtert das Handling mit der Pinzette. (B) Ein geeignetes Größenverhältnis der Einbettform zur Membran-Explantat-Kombination ist wichtig, damit keine zu große Trennschicht im Block entsteht (hier 8 x 12 mm Einbettform, 8 mm Ø Membran, 6 mm Ø Explantat). Markierungen auf der Form erleichterten später das Ausrichten des Blocks im Kryostat. (C) Die Membran ließ sich einfach mitschneiden und lag dem Schnitt als zweite Struktur sichtbar an bzw. kreuzte diesen (in diesem Fall unbedingt während des Färbevorgangs entfernen).

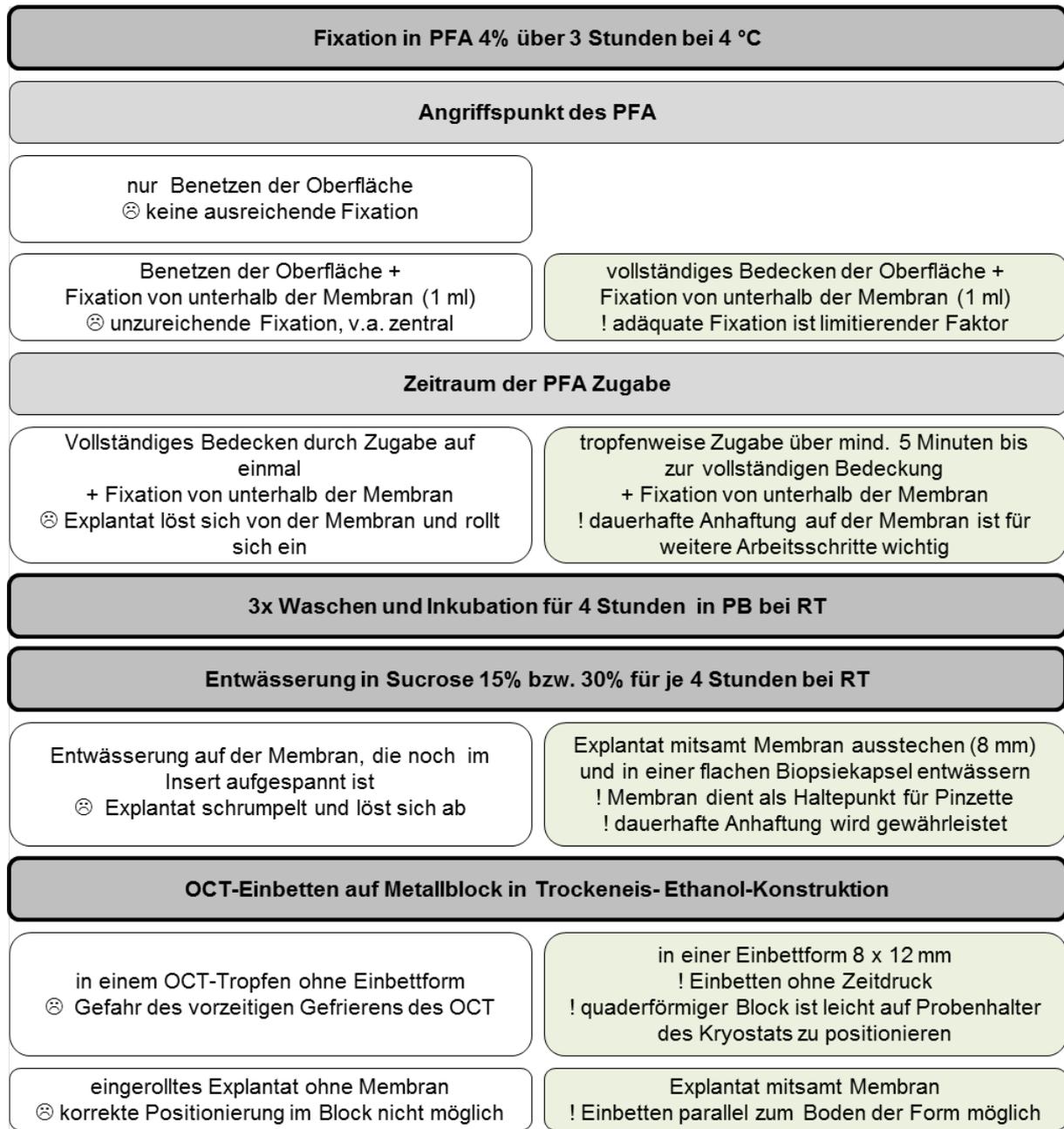


Abb. 4.20: Workflow für Fixation, Entwässerung und Einbettung von Explantaten.

Die grauen Kästen beschreiben die Arbeitsschritte des Protokolls, die Kästen dazwischen die Art der Durchführung dieser Arbeitsschritte. Alternativ getestete Methoden sind dabei gegenübergestellt. Die von uns übernommene Ausführung ist jeweils rechts und grün dargestellt. Mit „!“ ist gekennzeichnet, was mit der jeweiligen Methode erreicht/erleichtert werden soll. Die mit dem „☹“-Symbol markierten Nachteile begründen eine Ablehnung der Methode (transparente Kästen) bzw. die Einführung einer weiteren Alternative als Verbesserung.

RT: Raumtemperatur

4.3 Verifizierung von SPP1 im Schweinenetzhautmodell

Die proteomische Analyse des RMG-spezifischen Diabetesmodells hatte die Präsenz von SPP1 in Zelllysaten aus isolierten Schweine RMG nach insgesamt 17 Tagen in Kultur gezeigt (Abb. 4.2 und 4.4). Wir wollten daher die Expression von SPP1 in der intakten Schweineretina untersuchen, um RMG als Quelle der SPP1-Expression in der Netzhaut zu verifizieren.

4.3.1 SPP1 wurde in Müller Gliazellen exprimiert

Um das SPP1-Expressionsmuster in der Schweinenetzhaut zu untersuchen, erfolgte der immunhistologische Expressionsnachweis von SPP1 in Netzhautexplantaten nach drei Tagen in Kultur. SPP1 wurde sowohl in den Photorezeptor-Außensegmenten als auch in der inneren Neuroretina in der Nervenfaserschicht exprimiert (Abb. 4.21, obere Reihe, links).

Vimentin ist ein RMG-Markerprotein. Es zeigte sich ein charakteristisches Expressionsmuster für RMG, welches sich von den Endfüßen an der inneren Grenzmembran (ILM) über radiäre Fortsätze bis in die äußere Kernschicht erstreckte (Abb. 4.21, obere Reihe, Mitte). Die Doppelfärbung (Vimentin und SPP1) ergab eine Ko-Lokalisation in den RMG-Fortsätzen in der inneren Neuroretina (Abb. 4.21, obere Reihe). Dadurch konnten wir die RMG-assoziierte SPP1-Expression in einem *ex vivo* Netzhautmodell nachweisen.

4.3.2 Diabetische Kulturbedingungen führten zur SPP1-Expressionsminderung in Müller Gliazellen

Die quantitative Proteinanalyse isolierter RMG hatte eine signifikante Expressionsminderung von SPP1 durch beide diabetische Kulturbedingungen ergeben (Abb. 4.2 und 4.4). Wir wollten herausfinden, ob RMG auch im komplexeren Netzhautmodell mit einer SPP1-Expressionsminderung auf diabetische Kulturbedingungen reagieren.

Dazu kultivierten wir Netzhautexplantate über drei Tage und führten in Anlehnung an das RMG-spezifische Diabetesmodell zwei diabetische Behandlungen durch (Hyperglykämie, n=4 biologische Replikate und Glykolysehemmung, n=4 biologische Replikate). Als Kontrolle dienten Explantate einer Kontrollgruppe (Normoglykämie, n=4 biologische Replikate). Eine zusätzliche Gruppe für eine osmotische Kontrolle diente der Abschätzung von osmotischen Effekten unabhängig vom Glukosegehalt und von der Hemmung der Glykolyse (Osmotische Kontrolle, n=4 biologische Replikate).

Der Expressionsnachweis von SPP1 und Vimentin mittels immunhistologischer Doppelfärbungen ist in Abb. 4.21 dargestellt.

In allen vier Gruppen zeigte Vimentin ein charakteristisches, RMG-spezifisches Expressionsmuster (Abb. 4.21, mittlere Spalte).

In der normoglykämischen Gruppe war SPP1 in den Photorezeptor-Außensegmenten und in den RMG-Fortsätzen der inneren Neuroretina, ko-lokalisiert mit Vimentin, exprimiert (Abb. 4.21, obere Reihe).

In beiden diabetischen Behandlungsgruppen und in der osmotischen Kontrollgruppe ergab sich ein deutlicher Expressionsverlust der RMG-assoziierten SPP1-Expression in der inneren Neuroretina (Abb. 4.21). Hingegen war die SPP1-Expression in den Photorezeptor-Außensegmenten in allen Versuchsgruppen unverändert erhalten.

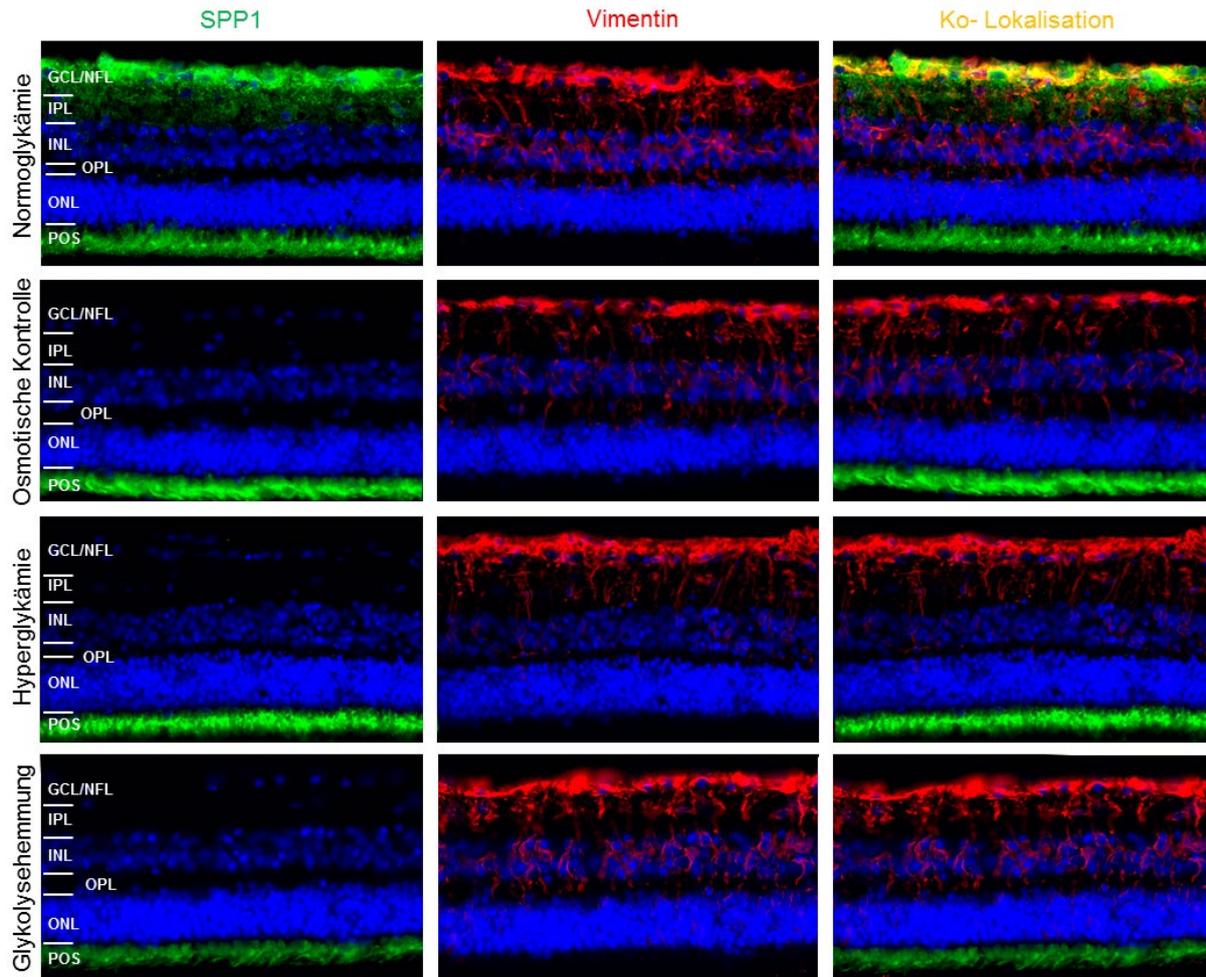


Abb. 4.21: Expression von SPP1 (grün) und des RMG-Markerproteins Vimentin (rot) in Netzhautexplantaten unter Hyperglykämie und unter Hemmung der Glykolyse im Vergleich zur normoglykämischen und osmotischen Kontrolle nach drei Tagen in Kultur, repräsentative Bildauswahl (n=4 Explantate pro Gruppe), 400-fache Vergrößerung.

In der Normoglykämie-Gruppe ergab sich ein RMG-assoziiertes SPP1-Expressionsmuster in der inneren Neuroretina, wie die Ko-Lokalisation mit Vimentin zeigte (gelb, obere Spalte, rechts). Die RMG-assoziierte Expression war in allen anderen Versuchsgruppen deutlich reduziert. Die Intensität der SPP1-Expression in den Photorezeptor-Außensegmenten zeigte sich unabhängig von der Behandlungsgruppe.

NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, POS: Photorezeptor-Außensegmente, Kernfärbung mit HOECHST 33342 (blau)

4.4 Charakterisierung des Schweinenetzhautmodells über die Zeit *in vitro*

Netzhautkulturen aus Schweineaugen hatten sich als geeignetes Modell für die Verifikation der SPP1-Expression unter diabetischen Kulturbedingungen herausgestellt (Kapitel 4.3). Um Netzhautkulturen auch in Zukunft für Experimente zu nutzen, wollten wir genauer untersuchen, wie lange wir die Kulturen erfolgreich *in vitro* halten konnten und wie sich die Kulturen durch Kultivierung veränderten. Dazu charakterisierten wir unsere Explantate nach drei, sechs, neun und 14 Tagen *in vitro*. Zunächst erfolgte erneut eine Beurteilung anhand des Erhalts der morphologischen Struktur in H&E Färbungen auf Kryoschnitten (4.4.1). Darüber hinaus beurteilten wir die Expression ausgesuchter Proteine zu den unterschiedlichen Zeitpunkten mithilfe immunhistologischer Färbungen auf Kryoschnitten (Kapitel 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4, 4.4.5). Alle Explantate für dieses Experiment (n=3 pro Zeitpunkt) wurden am selben Tag aus derselben Region 2b (aus dem visual streak, Kapitel 4.2.1) von unterschiedlichen Augen entnommen.

4.4.1 Die morphologische Netzhautschichtung blieb bis mindestens Tag 9 erhalten

Die morphologische Auswertung anhand von H&E Färbungen ergab den Erhalt der Netzhautschichtung über mindestens neun Tage *in vitro* (Abb. 4.22).

An Tag 3 waren die Photorezeptor-Außensegmente größtenteils erhalten. An Tag 6 kam es erstmals zu einem dezenten Verlust von Außensegmenten, was ab Tag 9 deutlich und nach 14 Tagen großflächig zu erkennen war. Ab Tag 3 trat außerdem zunehmend eine Verringerung der Zellkerndichte in der inneren, später auch in der äußeren Kernschicht auf. Alle Schichten der Netzhaut konnten bis einschließlich Tag 9 klar definiert werden. Allerdings war die Organisation der retinalen Schichtung an Tag 14 nicht mehr erkennbar, stattdessen bildete sich eine diffus aufgelöste Struktur mit losen Zellkernen zwischen der äußeren Grenzmembran und der Nervenfaserschicht.

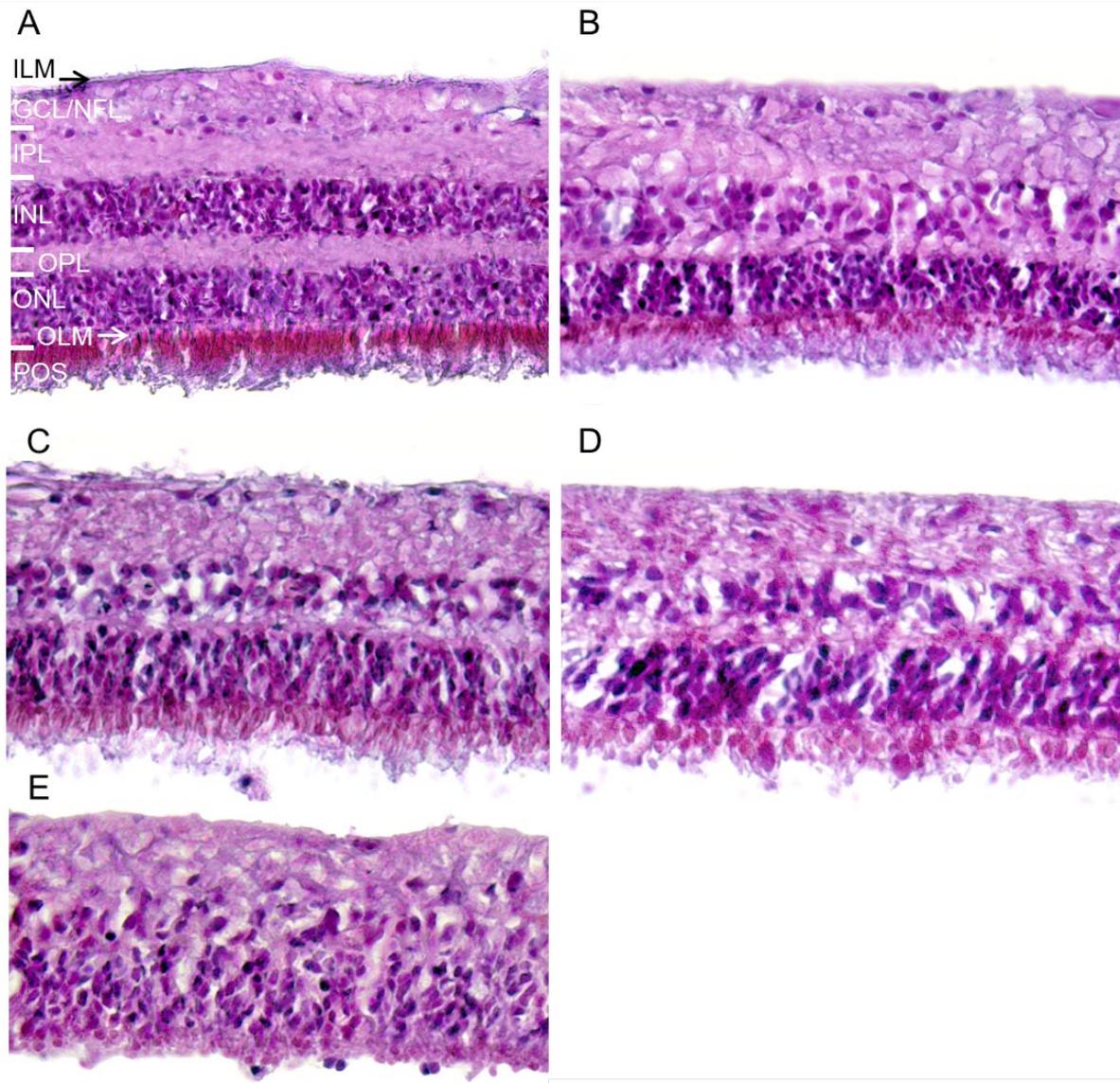


Abb. 4.22: Entwicklung der morphologischen Struktur der kultivierten Schweinenetzhaut in H&E Färbungen, repräsentative Bildauswahl (n=3 Explantate pro Zeitpunkt), 400-fache Vergrößerung.

(A) Frische Retina als Kontrolle; (B) Drei Tage in Kultur, vollständiger Erhalt der retinalen Schichtung. Erhalt der Photorezeptor-Außensegmente, beginnende Verminderung der Zellkerndichte vor allem in der inneren Kernschicht; (C) Sechs Tage in Kultur, vollständiger Erhalt der retinalen Schichtung, dezenter Verlust der Photorezeptor-Außensegmente, zunehmend geringere Zellkerndichte in der inneren Kernschicht; (D) Neun Tage in Kultur, vollständiger Erhalt der retinalen Schichtung, deutlicher Verlust der Photorezeptor-Außensegmente, deutlich verringerte Zellkerndichte in der inneren und äußeren Kernschicht; (E) 14 Tage in Kultur, retinale Schichtung aufgelöst;

ILM: innere Grenzmembran, NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, OLM: Äußere Grenzmembran, POS: Photorezeptor-Außensegmente

4.4.2 Die Morphologie der Zapfen blieb bis mindestens Tag 6 erhalten

Grob konnte die Morphologie der Photorezeptoren und vor allem der Erhalt der Außensegmente bereits anhand der H&E Färbungen eingeschätzt werden (Kapitel 4.4.1). Eine genauere Beurteilung der Zapfen erfolgte anhand des Expressionsnachweises von Cone Arrestin, einem Markerprotein für Zapfen, welches an der Signaltransduktion beteiligt ist (Abb. 4.23, grün), (Craft and Deming 2014).

Ab Tag 3 in Kultur stellte das Cone Arrestin-Expressionsmuster eine dezent beginnende Desorganisation der Innensegmente der Zapfen dar. An Tag 9 lagen deutlich deformierte Zapfen-Innensegmente vor. Dahingegen blieb die synaptische Endigung der Zapfen über mindestens neun Tage in Kultur voll ausgeprägt. An Tag 14 zeigte sich ein deutlicher Rückzug der synaptischen Endigungen zurück in die äußere Kernschicht sowie ein Verlust von Zapfen-Innensegmenten.

S-Opsin, das Photopigmentprotein der „blauen Zapfen“, einer bestimmten Zapfenart, wird spezifisch in den Außensegmenten blauer Zapfen exprimiert (Amann et al. 2014; Müller et al. 2017). Der Expressionsnachweis von Cone Arrestin und S-Opsin mittels immunhistologischer Doppelfärbungen ermöglichte die Identifizierung von blauen Zapfen anhand von deren Außensegmenten (Abb. 4.23, rot).

Bis einschließlich Tag 6 in Kultur zeigte sich eine erhaltene S-Opsin-Expression in den Zapfen-Außensegmenten blauer Zapfen. Am Tag 9 ging die Expression von S-Opsin fast vollständig verloren.

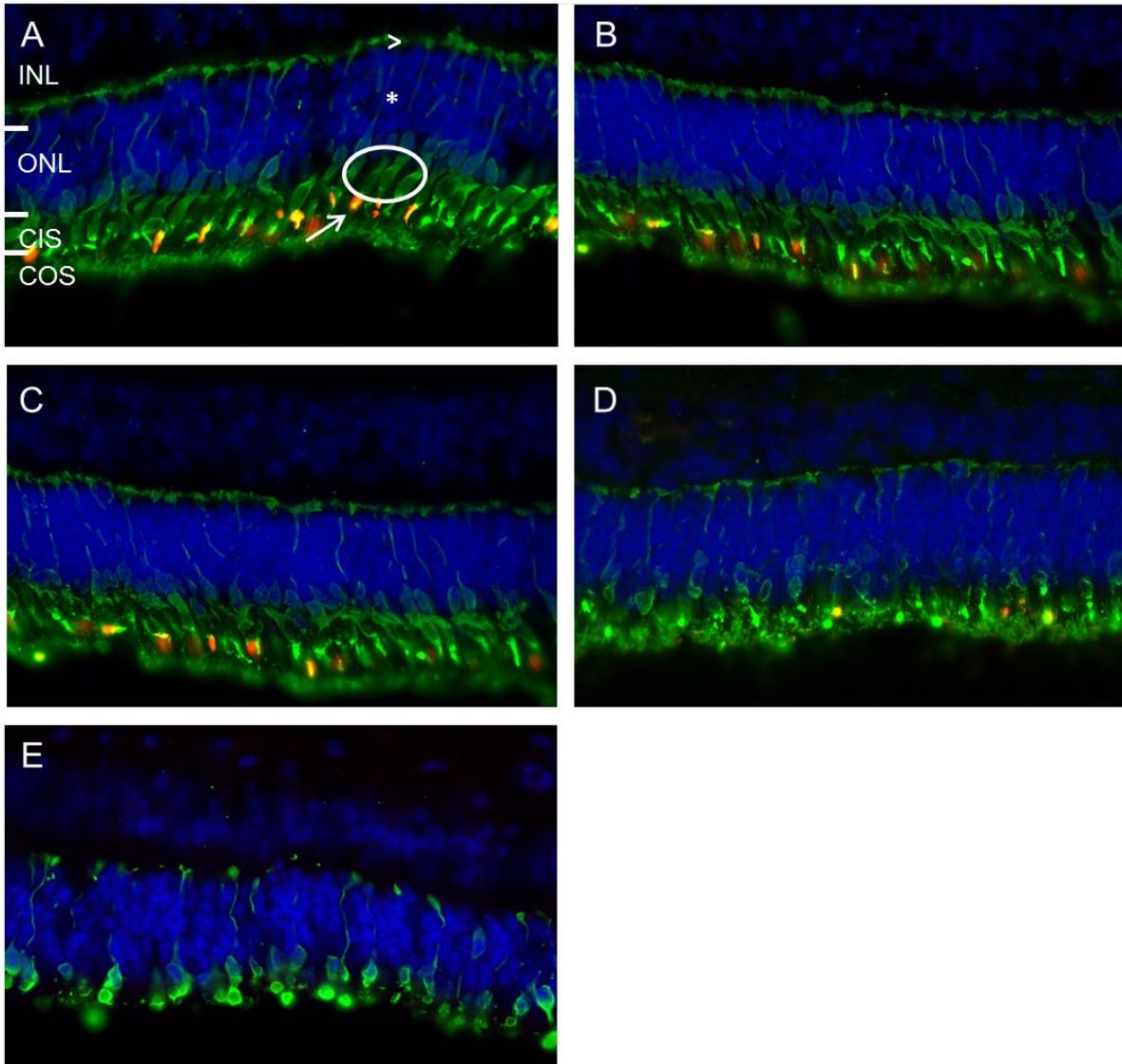


Abb. 4.23: Entwicklung der Expression von Cone Arrestin (grün) und S-Opsin (rot) in der kultivierten Schweinenetzhaut, repräsentative Bildauswahl (n=3 Explantate pro Zeitpunkt), 630-fache Vergrößerung.

(A) Frische Retina als Kontrolle, die Expression von Cone Arrestin in Zapfen kann von den synaptischen Endigungen in der inneren plexiformen Schicht (>) über die Zellkörper (*) und die Zapfen-Innensegmente (Kreis) bis zu den Zapfen-Außensegmenten (Pfeil) nachvollzogen werden; (B) Drei Tage in Kultur, regelmäßige Anordnung von Zapfen-Außensegmenten, speziell auch der Außensegmente blauer Zapfen (entspricht der Ko-Lokalisation Cone Arrestin und S-Opsin in Gelb), dezent beginnende Desorganisation der Zapfen-Innensegmente; (C) Sechs Tage in Kultur, synaptische Endigungen voll ausgeprägt, regelmäßige Anordnung von Zapfen-Außensegmenten inkl. der Außensegmente blauer Zapfen, dezente Desorganisation der Zapfen-Innensegmente; (D) Neun Tage in Kultur, deutliche Deformation der Zapfen-Innensegmente, deutlicher Verlust von Zapfen-Außensegmenten und fast vollständiger Verlust von Außensegmenten blauer Zapfen, synaptische Endigungen vollständig ausgeprägt; (E) 14 Tage in Kultur, Zapfen-Außensegmente kaum noch erhalten, deutlich verändertes Expressionsmuster im Bereich der synaptischen Endigungen;
INL: Innere Kernschicht, ONL; Äußere Kernschicht, CIS: Zapfen-Innensegmente, COS: Zapfen-Außensegmente, Zellkernfärbung mit HOECHST 33342 (blau)

4.4.3 Müller Gliazellen exprimierten über 14 Tage anhaltend Glutamin Synthetase

Der Expressionsnachweis des RMG-spezifischen Enzyms Glutamin Synthetase ergab eine anhaltende Expression bis einschließlich Tag 14 in Kultur (Abb. 4.24). Das charakteristische Expressionsmuster schloss zu allen Zeitpunkten die Nervenfaserschicht sowie radiär verlaufende RMG-Fortsätze ein.

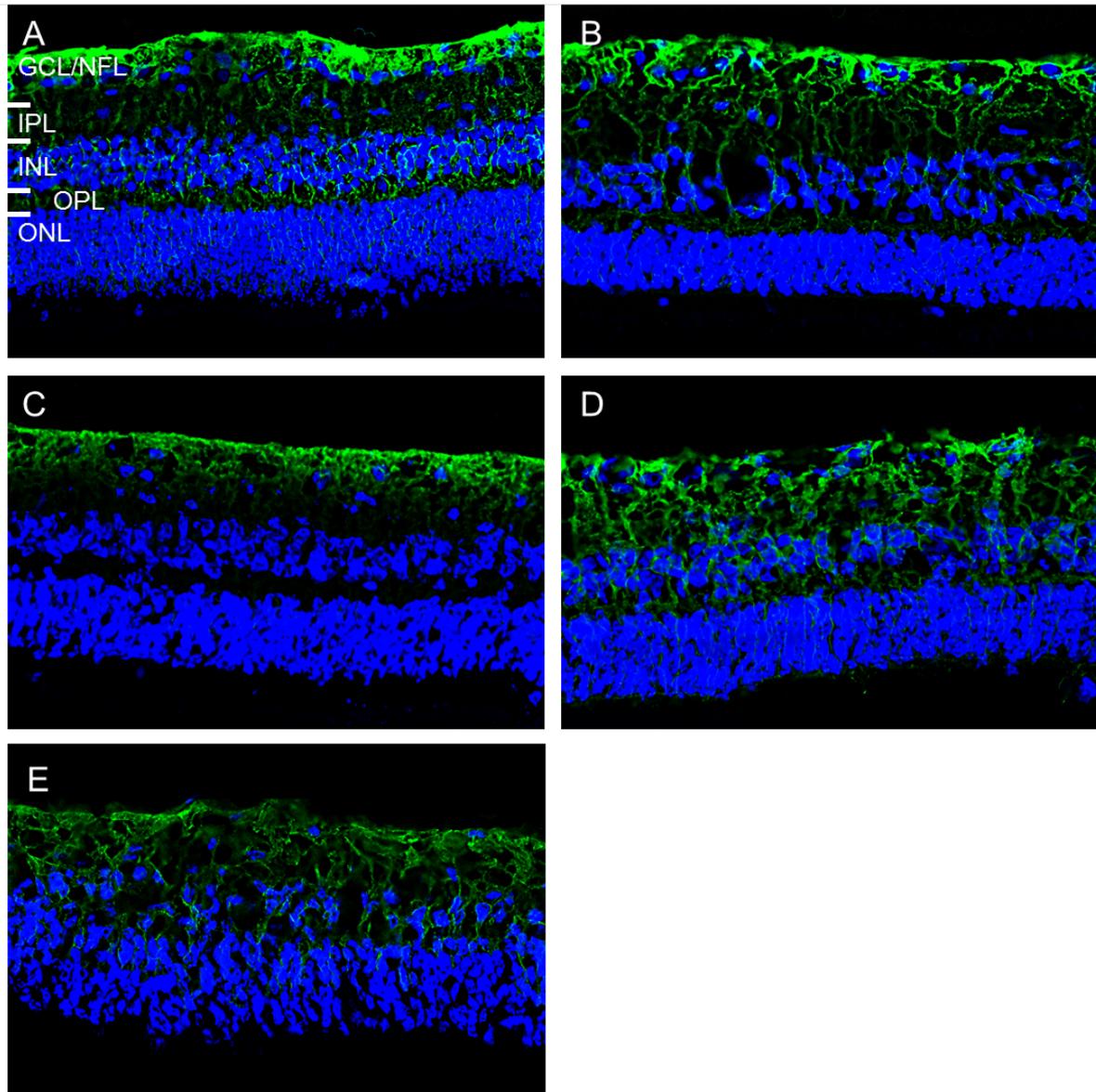


Abb. 4.24: Entwicklung der Expression von Glutamin Synthetase (grün) in der kultivierten Schweinenetzhaut, repräsentative Bildauswahl (n=3 Explantate pro Zeitpunkt), 400-fache Vergrößerung, Aufnahmen dekonvoliert.

(A) Frische Retina als Kontrolle; nach drei Tagen (B), sechs Tagen (C), neun Tagen (D), und 14 Tagen (E) in Kultur hielt die Expression von Glutamin Synthetase im Bereich der Nervenfaserschicht sowie in radiären RMG-Fortsätzen an;

NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, Zellkernfärbung mit HOECHST 33342 (blau)

4.4.4 Müller Gliazellen exprimierten über 14 Tage zunehmend Glial Fibrillary Acid Protein

Der Expressionsnachweis von GFAP ergab eine zunehmende Expression in RMG über die Zeit *in vitro* (Abb. 4.25). Während die Expression in den frischen Netzhäuten der Kontrollgruppe auf die Nervenfaserschicht beschränkt war, ergab sich ab Tag 6 in Kultur ein sich ausweitendes Expressionsmuster entlang radiärer RMG-Fortsätze, das an Tag 14 schließlich bis zur äußeren Grenzmembran reichte.

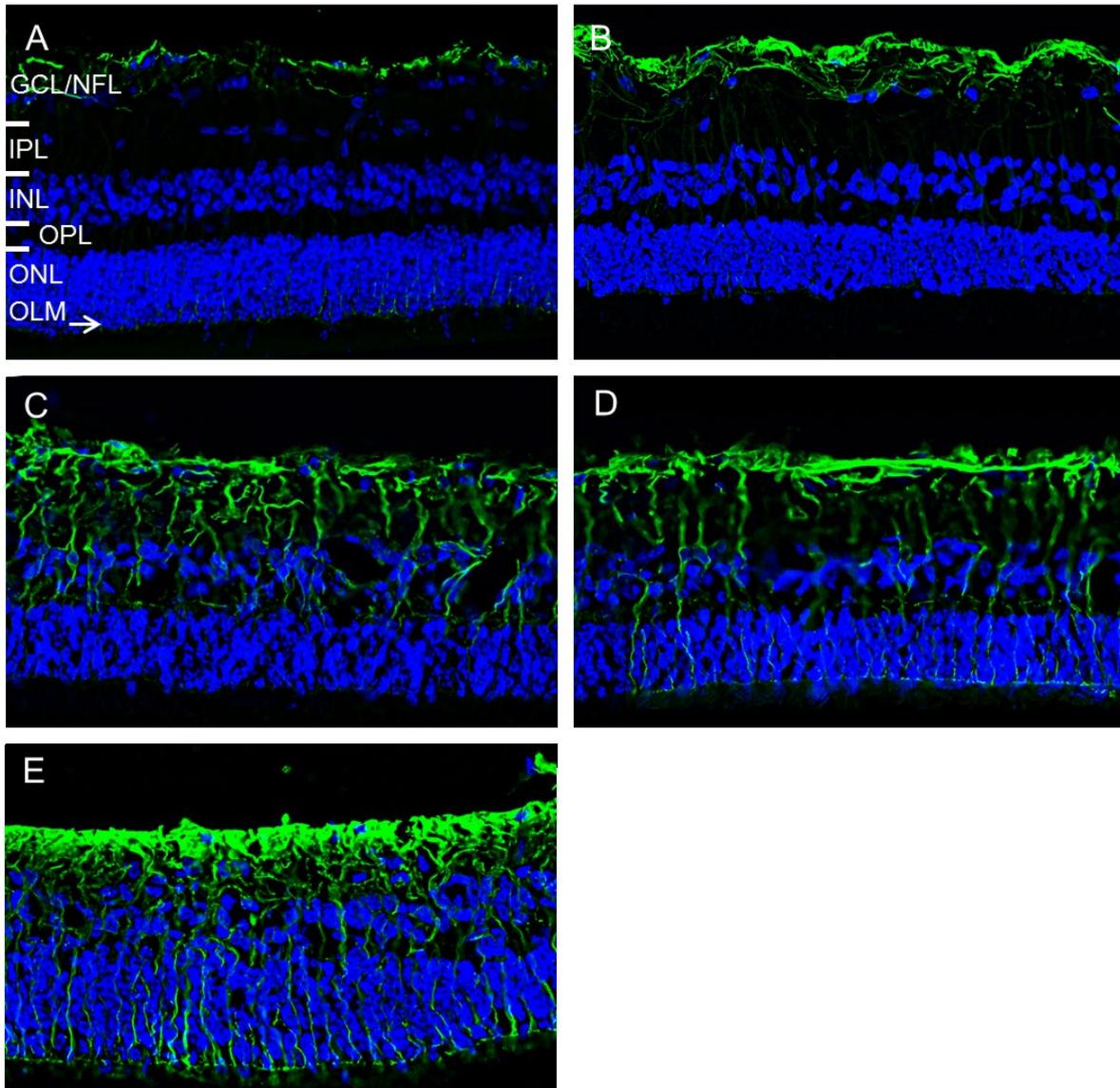


Abb. 4.25: Entwicklung der Expression von GFAP (grün) in der kultivierten Schweinenetzhaut, repräsentative Bildauswahl (n=3 Explantate pro Zeitpunkt), 400-fache Vergrößerung, Aufnahmen dekonvoliert.

(A) Frische Retina als Kontrolle; (B) Drei Tage in Kultur, zunehmende Expression im Bereich der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht; (C) Sechs Tage in Kultur, sich ausweitendes Expressionsmuster in radiären RMG-Fortsätzen bis in die äußere plexiforme Schicht; (D) Neun Tage in Kultur, radiäre Zellfortsätze erreichen teilweise die äußere Grenzmembran; (E) 14 Tage in Kultur, starke Expression im Bereich der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht, deutliche Zunahme der Expression in radiären Fortsätzen, die regelmäßig die äußere Grenzmembran erreichen;

NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, OLM: Äußere Grenzmembran, Zellkernfärbung mit HOECHST 33342 (blau)

Um die zunehmende GFAP-Expression in radiären RMG-Fortsätzen und auf Höhe der äußeren Grenzmembran näher zu untersuchen, wurden Doppelfärbungen mit Anti-GFAP und Anti-Cellular Retinaldehyd Binding Protein (CRALBP) an Tag 0 (frische Retina) und Tag 14 durchgeführt. CRALBP ist in der Neuroretina ein RMG-spezifisches Enzym, welches am visuellen Kreislauf beteiligt ist (Xue et al. 2015). In der frischen Retina durchzogen feine CRALBP-positive RMG-Fortsätze die Netzhaut bis in die äußere Kernschicht. Das entsprach einem RMG-assoziierten Expressionsmuster (Abb. 26A). Eine gekippte 3D-Projektion zur unteren Aufsicht auf die äußere Grenzmembran ergab keine CRALBP-Expression und damit keine sichtbaren Anteile von RMG (Abb. 4.26B). An Tag 14 war die RMG-assoziierte GFAP-Expression im Bereich der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht sehr intensiv (Abb. 4.26C, illustriert durch die Ko-Lokalisation in gelb). Die nun GFAP-positiven und radiär verlaufenden RMG-Fortsätze stellten sich deutlich plump dar. Die Expression auf Höhe der äußeren Grenzmembran in der gekippten 3D-Projektion zur unteren Aufsicht verdeutlichte die Präsenz von RMG im Bereich des subretinalen Raums an Tag 14 in Kultur (Abb. 4.26D).

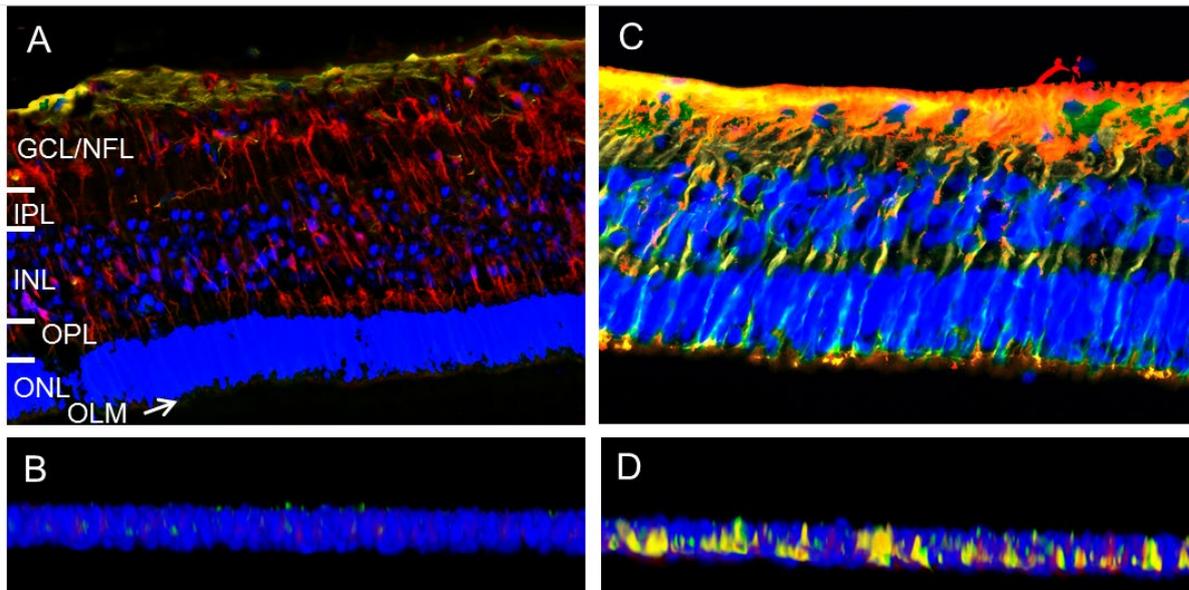


Abb. 4.26: Ko-Lokalisation (gelb) der Expression von GFAP (grün) und CRALBP (rot) im Vergleich zwischen frischer Retina und Explantat nach 14 Tagen in Kultur, repräsentative Bildauswahl (n=2 Explantate pro Zeitpunkt), 400-fache Vergrößerung, Aufnahmen dekonvoliert.

(A) Frische Retina als Kontrolle, CRALBP weist ein spezifisches, radiäres Expressionsmuster auf und illustriert feine RMG-Fortsätze durch die Retina bis in die äußere Kernschicht; RMG-assoziierte GFAP-Expression in der Nervenfaserschicht (gelb); (B) Frische Retina, gekippte 3D-Projektion von Bild (A) zur unteren Aufsicht auf die äußere Grenzmembran, keine Expression beider Proteine, somit sind keine RMG-Fortsätze außerhalb der äußeren Kernschicht erkennbar; (C) 14 Tage in Kultur, Ko-Lokalisation im Bereich der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht sowie in deutlich plumpen RMG-Fortsätzen bis unterhalb der äußeren Kernschicht; (D) 14 Tage in Kultur, gekippte 3D-Projektion von Bild (C) zur unteren Aufsicht auf die äußere Grenzmembran, Präsenz von RMG-Fortsätzen im subretinalen Raum;

NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, OLM: Äußere Grenzmembran, Zellkernfärbung mit HOECHST 33342 (blau)

4.4.5 Axonbündel der Nervenfaserschicht blieben bis Tag 14 erhalten

Um den Zustand der Nervenzellfortsätze über die Zeit *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Expressionsnachweis von Neurofilament 200 (NEFH) durchgeführt. NEFH hat in der Retina verschiedener Spezies ein spezifisches Expressionsmuster entlang horizontaler Nervenzellfortsätze (Chévez and Font 1993; Blank, Müller, and Korf 1997; Ruiz-Ederra et al. 2004). Demnach ergab sich in den frischen Netzhäuten der Kontrollgruppe ein spezifisches Expressionsmuster entlang der Axone von Ganglienzellen in der Nervenfaserschicht unmittelbar an der vitreoretinalen Grenze, sowie in horizontal verlaufenden Nervenzellfortsätzen in der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 4.27). Mit zunehmender Dauer der Kultivierung (bis einschließlich Tag 14) kam es zum beinahe vollständigen Verlust der Expression in der äußeren plexiformen Schicht. Die Expression in der Nervenfaserschicht begann sich ab Tag 6 in Kultur geringgradig zu verändern (Fragmentierung und Zurückweichen von der vitreoretinalen Grenze), blieb jedoch über den Zeitraum von 14 Tagen erhalten.

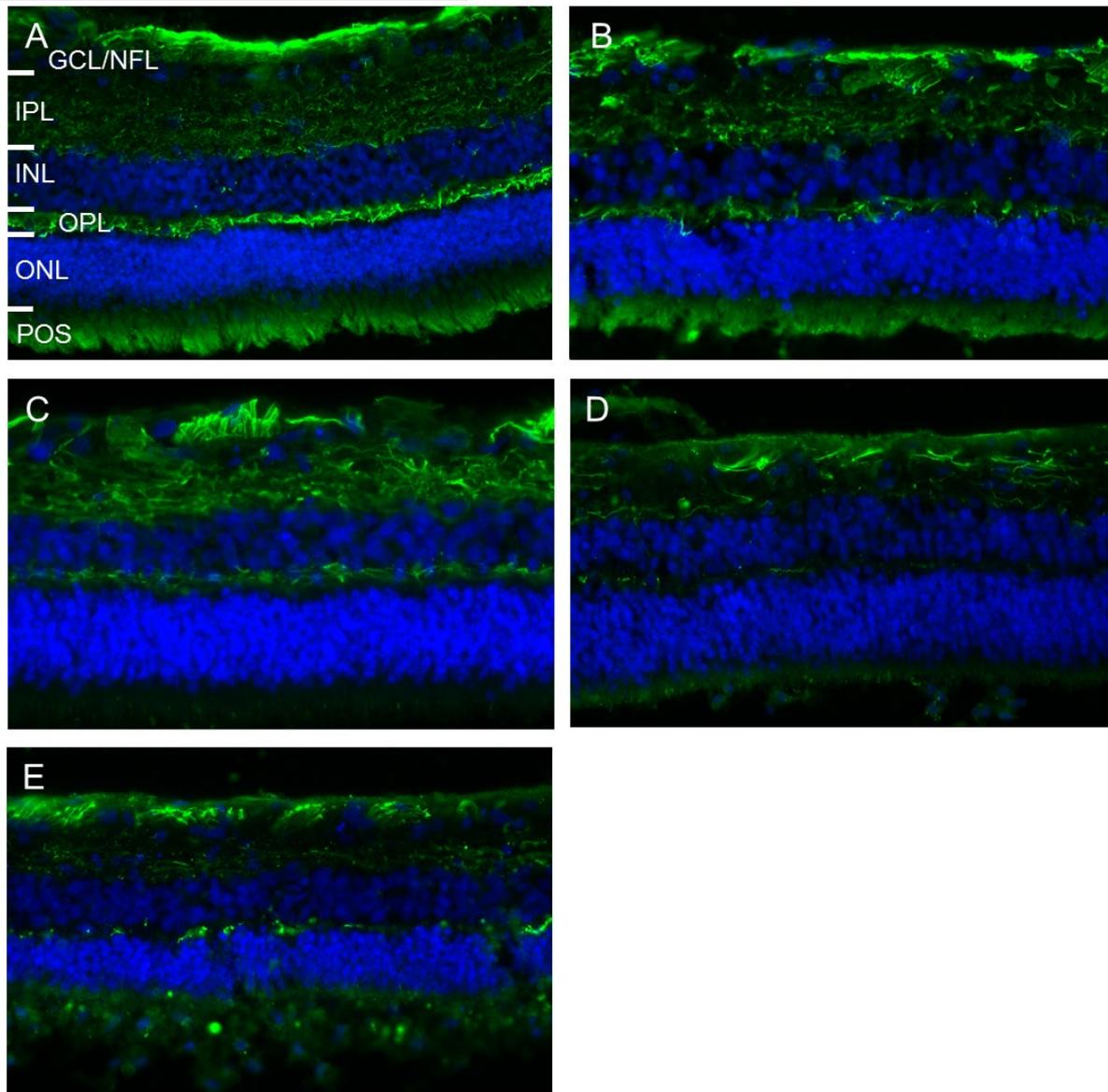


Abb. 4.27: Entwicklung der Expression von NEFH (grün) in der kultivierten Schweinenetzhaut, repräsentative Bildauswahl (n=3 Explantate pro Zeitpunkt), 400-fache Vergrößerung.

(A) Frische Retina als Kontrolle, Expression entlang horizontaler Nervenzellfortsätze in der Nervenfaserschicht sowie in der äußeren plexiformen Schicht; (B) Drei Tage in Kultur, beginnender Verlust der Expression im Bereich der äußeren plexiformen Schicht; (C) Sechs Tage in Kultur, zunehmender Verlust der Expression in der äußeren plexiformen Schicht, beginnende Veränderung des Expressionsmusters in der Nervenfaserschicht; (D) Neun Tage in Kultur, beinahe vollständiger Verlust der Expression in der äußeren plexiformen Schicht, (E) 14 Tage in Kultur, Expression in der Nervenfaserschicht wirkt verändert (Fragmentierung und Zurückweichen von der vitreoretinalen Grenze), ist jedoch erhalten;

NFL: Nervenfaserschicht, GCL: Ganglienzellschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Kernschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Kernschicht, POS: Photorezeptor-Außensegmente, Zellkernfärbung mit HOECHST 33342 (blau)

4.4.6 Das Netzhautproteom änderte sich kaum nach drei Tagen in Kultur

Um einzuschätzen, inwieweit die Retina durch die Kultivierung ihr proteomisches Repertoire verändert, wurden Explantate nach drei Tagen *in vitro* im Massenspektrometer proteomisch charakterisiert (n=6). Zum Vergleich wurde ein Datensatz mit frischen Schweinenetzhäuten (n=3) erstellt.

Insgesamt konnten 2214 gleiche Proteine sowohl in frischer als auch in kultivierter Retina identifiziert werden. Wir verglichen die Abundanzverteilung dieser gemeinsam identifizierten Proteine bezogen auf den jeweiligen Gesamtdatensatz. Die resultierende Korrelation ist in einem Abundanzplot dargestellt (Abb. 4.28). Dabei wurde insbesondere die Abundanz ausgesuchter Netzhautmarkerproteine berücksichtigt. Dazu zählen zelltypspezifische Marker, wie Vimentin und GFAP (für RMG), Recoverin und Rhodopsin (für Photorezeptoren), Calbindin (für Horizontalzellen), Syntaxin (für Amakrinzellen) und das strukturelle Neurofilament 200 (für horizontale Nervenzellfortsätze), (Johansson, Eftekhari, and Warfvinge 2010; Haverkamp and Wässle 2000; Cheng, Djajadi, and Molday 2013). Funktionelle Marker waren Glutamin Synthetase und der Glial High Affinity Glutamate Transporter (für RMG), Synaptobrevin (für die synaptische Vesikelbildung) und Synapse Associated Protein 90 (ein synaptisches Protein der Photorezeptoren), (Johansson, Eftekhari, and Warfvinge 2010; Haverkamp and Wässle 2000; Cheng, Djajadi, and Molday 2013).

Die Abundanzverteilung der gemeinsam identifizierten Proteine war in beiden Datensätzen sehr ähnlich (mittelstarke Korrelation, Abb. 4.28). Wichtige Netzhautmarkerproteine wurden relativ zum Gesamtdatensatz mit vergleichbaren Abundanzwerten exprimiert (abzulesen an der Nähe zur Trendlinie, Abb. 4.28). Dabei zeigten Glutamin Synthetase und VAMP1 nahezu identische relative Abundanzwerte (abzulesen an der Lage direkt auf der Trendlinie). Fast alle anderen Markerproteine wurden in frischer Retina verglichen mit den Explantaten nach drei Tagen *in vitro* bezogen auf den jeweiligen Datensatz geringfügig höher exprimiert (abzulesen an der Lage oberhalb der Trendlinie).

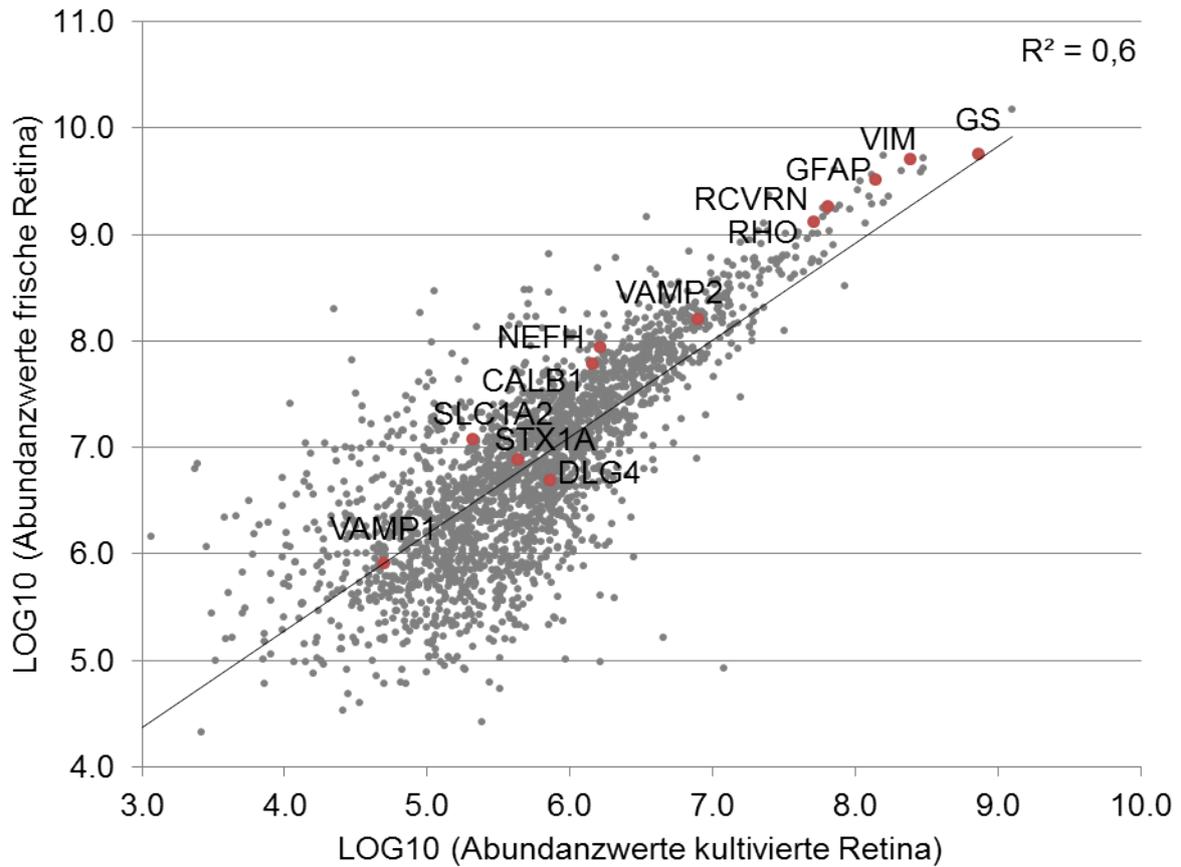


Abb. 4.28: Korrelation der Abundanz von 2214 gemeinsam identifizierten Proteinen in frischer (n=3) verglichen mit drei Tage lang kultivierter Retina (n=6).

Abundanzverteilung (log10 transformierte Abundanzwerte) in frischer (y-Achse) und in kultivierter Retina (x-Achse) bezogen auf den jeweiligen Datensatz. Die linear verlaufende Trendlinie zeigt für die Gesamtheit der untersuchten Proteine eine Korrelation zwischen beiden Abundanzverteilungen mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,6. Wichtige zelluläre, strukturelle und funktionelle Netzhautmarkerproteine sind rot gekennzeichnet.

GS: Glutamin Synthetase, VIM: Vimentin, GFAP: Glial Fibrillary Acid Protein, RCVRN: Recoverin, RHO: Rhodopsin, VAMP1 und 2: Synaptobrevin 1 und 2, NEFH: Neurofilament 200, CALB1: Calbindin, STX1A: Syntaxin, SLC1A2: Glial High Affinity Glutamate Transporter, DLG4: Synapse-associated Protein 90

5 DISKUSSION

Die DR ist eine Komplikation von Diabetes mellitus, die zu einer erheblichen Beeinträchtigung des Sehvermögens bis hin zur vollständigen Erblindung führen kann (Flaxman et al. 2017). Für die Untersuchungen im Rahmen dieses Projekts standen uns Erkenntnisse aus einem neuen Diabetesmodell im INS^{C94Y}-Schwein zur Verfügung, das unsere Gruppe kürzlich hinsichtlich der Pathophysiologie am Auge charakterisiert hat (Kleinwort et al. 2017). Dabei konnten etliche Merkmale der DR des Menschen nachgewiesen werden, die das Modell als vielversprechendes translationales Modell erscheinen lassen (Kleinwort et al. 2017). Zu diesen Merkmalen gehören auch funktionelle Veränderungen von RMG (Kleinwort et al. 2017). In der Pathophysiologie der DR scheinen veränderte RMG eine wichtige Bedeutung zu haben (Coughlin, Feenstra, and Mohr 2017). Die molekularen Mechanismen, die sich in RMG bei Diabetes mellitus verändern, sind allerdings bisher unverstanden (McDowell et al. 2018). Ein wesentliches Ziel dieses Projekts war deshalb die Aufklärung von Mechanismen, die in RMG des Schweines unter einer diabetischen Stoffwechselsituation auf Proteinebene auftreten.

Um diabetische Bedingungen in unserem RMG-Modell zu simulieren, standen wir vor der Herausforderung, das komplexe diabetische Milieu *in vivo* in Kultur herzustellen (Mohammad Shamsul Ola et al. 2012). Bei Diabetes mellitus spielen dysregulierte Werte von Glukose, Lipiden und Aminosäuren sowie zahlreiche Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren und Entzündungsmoleküle, eine Rolle (Mohammad Shamsul Ola et al. 2012). Alle Faktoren unter Versuchsbedingungen zu berücksichtigen ist so gut wie unmöglich. Hier konzentrierten wir uns, in Anlehnung an eine Publikation über *in vitro* Alternativen in der DR-Forschung, auf den Aspekt des diabetischen Glukosestoffwechsels (Valdés et al. 2016). Wir simulierten in getrennten Behandlungsansätzen zwei Formen eines gestörten Glukosestoffwechsels, die bei Diabetes mellitus auftreten: Die Hyperglykämie und die Glykolysehemmung (Valdés et al. 2016). Valdés et al. beschreiben beide Ansätze als geeignet, um die DR in der Mäusenetzhaut *in vitro* zu studieren (Valdés et al. 2016).

Unseres Wissens nach existiert keine Studie, die den Einfluss einer Glykolysehemmung auf RMG in einem diabetischen Kontext untersucht (Pubmed-Recherche: Stand 17. Dezember 2019). Und das obwohl bekannt ist, dass die Glykolyse in der Rattenetzhaut bei Diabetes mellitus gehemmt ist (M. Shamsul Ola

et al. 2006; Santiago 2009). Diese Hemmung könnte auf die Inaktivität glykolytischer Enzyme zurückzuführen sein, die bei Ratten in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung einer Retinopathie steht (Kanwar and Kowluru 2009). In Anlehnung an diesen Befund erschien es uns plausibel, die Glykolysehemmung in unserem Modell durch enzymatische Hemmung auszulösen. Dazu eignet sich die Zugabe von 2-Deoxyglukose (2-DG) in das Kulturmedium (D. Zhang et al. 2016). 2-DG ist ein synthetisches Glukoseanalogon, welches von RMG aus Säugetieren *in vitro* wie Glukose aufgenommen und phosphoryliert wird (C. Poitry-Yamate and Tsacopoulos 1991; Barry S. Winkler et al. 2003). Die Aufnahme von 2-DG steht in Konkurrenz mit der Glukoseaufnahme, da es über dieselben Transporter transferiert wird (Tran et al. 2016). Phosphoryliertes 2-DG kann nicht weiter metabolisiert werden und reichert sich in der Zelle an, was zu einer nicht-kompetitiven Hemmung der Hexokinase und somit zur Hemmung der Glykolyse führt (D. Zhang et al. 2016). Valdés et al. setzen in ihrem diabetischen Mäusenetzhautmodell zur Glykolysehemmung eine 2-DG Konzentration im Verhältnis 1:1 zur Glukosekonzentration während 24 Stunden ein (Valdés et al. 2016). In Anlehnung daran wendeten wir 2-DG in der Glykolysehemmungs-Gruppe ebenfalls über 24 Stunden an, allerdings im fast vierfachen Überschuss verglichen mit der Glukosekonzentration, um eine möglichst umfassende Hemmung der Glykolyse zu erreichen.

Sowohl durch die hyperglykämische Behandlung als auch durch die Glykolysehemmung induzierten wir eine behandlungsspezifische Veränderung im gesamten RMG-Proteom des Schweines, das insgesamt 2744 Proteine umfasste (Kapitel 4.1.1). Unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanz und eines, auf den Daten basierenden, Mindestwerts für die Expressionsänderung waren in der Hyperglykämie-Gruppe insgesamt 103 Proteine und in der Glykolysehemmungs-Gruppe 240 Proteine differenziell exprimiert (Kapitel 4.1.2, 4.1.4). Interessanterweise ergab der biologische Kontext der differenziell veränderten Proteine für beide Behandlungsgruppen unabhängig voneinander dieselben ECM-assoziierten Prozesse (Abb. 4.3, 4.5). Dementsprechend waren unter den signifikant veränderten Proteinen in beiden Gruppen auffallend viele Mitglieder der ECM-Proteinfamilie (Tabelle 4.1, 4.2). Besonders auffällig war, dass der Großteil dieser ECM-Proteine in beiden Gruppen vermindert exprimiert vorlag. Unter den verminderten Proteinen befanden sich in beiden Gruppen einige Kollagen- α -Ketten, als Bestandteil der Kollagene, sowie Glykoproteine, wie Fibronectin. Sieben der Kollagen- α -Ketten

sowie Fibronectin lagen in beiden Behandlungsansätzen übereinstimmend vermindert vor (Tabelle 4.3). Der übereinstimmenden Verminderung dieser Proteine in beiden Behandlungsgruppen schrieben wir eine besonders hohe Aussagekraft zu, weil so die zwei Formen des gestörten Glukosestoffwechsels bei Diabetes mellitus unabhängig voneinander einbezogen wurden. Dies gewährleistet es unserer Meinung nach, das diabetische Milieu *in vivo* hinsichtlich des Glukosestoffwechsels möglichst umfassend zu berücksichtigen.

Kollagene sind aus α -Ketten aufgebaut und bilden in der ECM ein Gerüst aus Fasern, das die strukturelle Hauptkomponente der ECM darstellt (Frantz, Stewart, and Weaver 2010). Auch Fibronectin ist ein faserförmiges ECM-Protein, welches eine wichtige Bedeutung als Verbindungsglied zwischen Zellen und der umliegenden ECM hat (Singh, Carraher, and Schwarzbauer 2010). Die Verminderung dieser ECM-Komponenten in RMG könnte eine verminderte Sekretion in die umliegende ECM bedeuten. Dabei käme es über eine Verminderung von Gerüstsubstanz (Kollagen- α -Ketten) sowie über eine Verschlechterung der zellulären Anheftung (Fibronectin) zu einer Destabilisierung der ECM, die die RMG umgibt.

Mit dieser Hypothese übereinstimmend lagen auch ECM-Regulatorproteine, wie die Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenasen 1 bis 3, vermindert exprimiert vor (Tabelle 4.1, 4.2, 4.3). Diese Enzyme haben eine essentielle Rolle bei der Kollagenfaserbildung und somit beim Aufbau eines intakten Fasergerüsts (Qi and Xu 2018). Die verminderte Expression dieser Proteine könnte daher zu einer weiteren Destabilisierung der ECM um RMG beitragen.

Eine ECM-Struktur mit enger Verknüpfung zu den Endfüßen von RMG ist die ILM, eine dünne ECM-Schicht an der Innenfläche der Netzhaut (Syrbe et al. 2018). Zellkulturexperimente an RMG des Menschen deuten darauf hin, dass RMG ECM-Proteine, wie Kollagen- α -Ketten, produzieren, die in der ILM vorkommen (Ponsioen et al. 2008). Basierend auf diesem Ergebnis stellen wir die Hypothese auf, dass RMG in der DR einen Einfluss auf die Zusammensetzung der ECM in der ILM ausüben. Die RMG-vermittelte Destabilisierung der ECM könnte so zu strukturellen Schäden der ILM bei der DR führen. Damit übereinstimmend beobachteten wir in beiden Behandlungsgruppen eine verminderte Expression von drei Integrin- α -Untereinheiten (Tabelle 4.3). Integrine sind aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut und gelten als Schlüsselfaktoren für die korrekte Verknüpfung von ECM-Proteinen in der ILM (Halfter et al. 2008). Eine verminderte Expression von Integrin- α -Untereinheiten in

RMG könnte eine verminderte Bereitstellung von Integrinen für die Verknüpfung der ECM in der ILM bedeuten. Dies würde zu einer zusätzlichen Destabilisierung dieser Membran führen.

Die Vermutung, dass eine Destabilisierung der ECM zur Destabilisierung der ILM führen könnte, deckt sich mit Erkenntnissen unserer Gruppe über eine Auflösung der ILM im diabetischen Schweinmodell (Kleinwort et al. 2017). Die in unserem RMG-Diabetesmodell gewonnenen Erkenntnisse könnten einen möglichen Pathogenesemechanismus erklären, der sich hinter der Auflösung der ILM im diabetischen Schweinmodell verbirgt.

Bei der Auswertung unserer Daten, bei der wir diesen potenziellen Pathogenesemechanismus identifiziert haben, sind wir bewusst „nicht-hypothesengesteuert“ vorgegangen. Wir haben zunächst die Veränderungen im RMG-Proteom in ihrer Gesamtheit berücksichtigt (Kapitel 4.1.1) und anschließend eine ganze Gruppe funktionell verwandter ECM-Proteine für die Hypothesengenerierung herangezogen (Kapitel 4.1.2, 4.1.4, 4.1.7). Uns ist keine Studie bekannt, in der eine proteomweite Reaktion in RMG unter einer diabetischen Stoffwechselsituation anhand einer umfassenden, differenziellen Proteomanalyse beschrieben wird (Pubmed-Recherche: Stand 23. Dezember 2019). Einige Studien beschäftigen sich zwar mit Proteinexpressionsänderungen in RMG unter hyperglykämischen Kulturbedingungen, die Untersuchungen sind dabei allerdings auf einzelne Proteine und damit zusammenhängende Mechanismen beschränkt (Fan et al. 2014; Zhao et al. 2015; Matteucci et al. 2014; Duarte et al. 2016; Zhou et al. 2016; Luo et al. 2016). Beispielsweise wurde in primären RMG aus Ratten der Mechanismus der RMG-Gliose anhand der Expressionsänderung des gliotischen Markerproteins GFAP untersucht (Matteucci et al. 2014; Duarte et al. 2016; Fan et al. 2014; Zhao et al. 2015). Die genannten Studien basieren bei der Untersuchung von veränderten Proteinexpressionsmustern auf einer Hypothese, der die gezielte Untersuchung bestimmter Proteine folgt. Eine proteomweite Untersuchung ermöglicht es hingegen, neue Zielmoleküle mit einer Schlüsselposition in der Pathogenese der DR und damit verbundene, unbekannte Mechanismen zu identifizieren (Hauck et al. 2012). Die RMG-vermittelte Destabilisierung der ECM, die möglicherweise zur Auflösung der ILM bei Diabetes mellitus beiträgt, wäre ein

solcher bisher unbekannter Mechanismus (Pubmed-Recherche: Stand 17. Dezember 2019).

In unserem Modell war eine dreitägige diabetische Behandlung ausreichend, um eine substantielle Expressionsänderung von ECM-Proteinen zu induzieren (Kapitel 4.1.3, 4.1.5). Das ist unserer Meinung nach ein Hinweis darauf, dass die Auflösung der ILM bereits in einem sehr frühen Stadium der DR von RMG initiiert werden könnte. Das Verständnis von Prozessen, die in der Pathogenese initial passieren, ist eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von Therapieformen, die in einem frühen Krankheitsstadium ansetzen (Miljković and Spasojević 2013). Wenn die Auflösung der ILM bei der DR in Zukunft therapeutisch verhindert werden könnte, könnten auch schwere Folgekomplikationen, wie die Ansammlung von harten Exsudaten, vermieden werden (Kleinwort et al. 2017).

Die Übertragbarkeit der hier beobachteten ECM-Proteinexpressionsänderungen *in vitro* auf die *in vivo* Situation bei Diabetes mellitus könnte durch die artifiziellen Bedingungen grundsätzlich eingeschränkt sein (Ghallab 2013). Durch die Verwendung von primären RMG bewegten wir uns deutlich näher an der *in vivo* Situation als es bei der Verwendung von immortalisierten Zellen möglich gewesen wäre (Zalis, Johansson, and Englund-Johansson 2017; Ponsioen et al. 2008). Trotzdem entsprechen primäre Netzhautzellen in Kultur nicht dem dissoziierten Ebenbild der Zellen *in vivo* (Hauck, Suppmann, and Ueffing 2003; Szober et al. 2012). Beispielsweise hat eine vorangegangene Studie gezeigt, dass primäre Schweine RMG ihr Proteom durch die Kultivierung deutlich verändern (Hauck, Suppmann, and Ueffing 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass diese kulturinduzierten Veränderungen auch das ECM-Proteinrepertoire betreffen. Überdies ist bekannt, dass insbesondere die ECM-Proteinexpression stark von der zellulären Umgebung abhängt, die im Fall der Einzelzellkultur nicht der *in vivo* Situation entspricht (Jhala et al. 2019). Somit wäre es denkbar, dass die von uns beobachtete Expressionsänderung zahlreicher ECM-Proteine infolge einer diabetischen Stoffwechselsituation *in vitro* die Reaktion von RMG bei Diabetes mellitus *in vivo* nicht bzw. nicht vollumfänglich repräsentieren kann. Für weiterführende Untersuchungen würden sich deshalb organotypische Netzhautkulturen aus Schweinen anbieten, weil sie die Netzhaut nahe an der *in vivo* Situation abbilden (Schnichels et al. 2019). Wir gehen davon aus, dass das ECM-

Proteinrepertoire von RMG und damit verbunden auch die Expressionsänderung von ECM-Proteinen unter diabetischen Bedingungen in intakten Netzhautkulturen umfassender als in isolierten RMG studiert werden können. Zu diesem Zweck haben wir im Rahmen des Projekts ein organotypisches Schweinenetzhautmodell aufgebaut (Kapitel 4.2). In Zukunft könnten bildgebende Verfahren an Schweinenetzhautexplantaten unter diabetischen Kulturbedingungen im Vergleich zur Kontrollbedingung zeigen, ob in der ILM ein verminderter Gehalt von Kollagen- α -Ketten oder Fibronectin vorliegt. Auch die verminderte Expression der Integrin- α -Untereinheiten und der Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenasen könnten so verifiziert werden. Unsere Liste veränderter ECM-Proteine könnte dabei Hinweise geben, welche weiteren ECM-Proteine potenziell entscheidende Kandidaten für die Auflösung der ILM sein könnten (Tabelle 4.3).

Schlussendlich wird geklärt werden müssen, in welchem Umfang die Ergebnisse aus unseren Modellen auf die Pathogenese der DR des Menschen übertragbar sind. Grundsätzlich ist von einem hohen translationalen Wert auszugehen, da sich Schweine- und Menschengenen nicht nur grundsätzlich gleichen, sondern auch identische pathophysiologische Merkmale aufgrund von Diabetes mellitus entwickeln (Kleinwort et al. 2017). Dennoch ist die Übertragbarkeit aller in diesem Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse auf die DR des Menschen nicht garantiert. In einem ersten Schritt könnte versucht werden, die Ergebnisse in Spendernetzhautkulturen des Menschen zu reproduzieren.

Bei der Auswertung der Proteinexpressionsänderungen in unserem RMG-Diabetesmodells war für uns, neben den ECM-Proteinen, vor allem SPP1 ein interessanter Kandidat (Kapitel 4.1.2, 4.1.4, 4.1.7). Auch dieses Protein lag in beiden Behandlungsgruppen übereinstimmend vermindert vor, was die Berücksichtigung beider Formen des gestörten Glukosestoffwechsels bei Diabetes mellitus gewährleisten sollte (Tabelle 4.3). Unsere Gruppe war bisher an zwei proteomischen Studien über Schweine RMG beteiligt, in denen die SPP1-Sekretion von RMG nachgewiesen wurde (von Toerne et al. 2014; Ruzafa, Pereiro, Lepper, et al. 2018). Dennoch fehlen in der Literatur unserer Kenntnis nach nähere Informationen zu SPP1 in dieser Spezies, darunter beispielsweise das Expressionsmuster in der Schweinenetzhaut (Pubmed-Recherche: Stand 29. November 2019). Darüber hinaus hat unsere Gruppe in der Netzhaut von Pferden mit autoimmuner Uveitis eine SPP1-

Expressionsminderung in RMG nachgewiesen (Deeg et al. 2011). Deshalb interessierten wir uns besonders für die Expressionsminderung in einem diabetischen Kontext. Außerdem wird die Rolle von SPP1 in der Netzhaut kontrovers diskutiert, sodass neue Erkenntnisse in einem Diabetesmodell wertvolle Informationen über die Funktion von SPP1 in der Netzhaut liefern könnten (Deeg et al. 2011; Ruzafa, Pereiro, Aspichueta, et al. 2018). Aus diesen Gründen haben wir SPP1 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Für die Verifizierung wollten wir organotypische Netzhautkulturen aus Schweinen verwenden. Ziel war es, die Netzhaut in Kultur denselben diabetischen Behandlungen zu unterziehen, wie wir sie in unserem isolierten RMG-Modell durchgeführt haben. Die Definition des SPP1-Expressionsmusters in der Schweinenetzhaut sowie die Verifikation der SPP1-Expressionsminderung sollten dann mittels bildgebender Verfahren erfolgen. Um dies umsetzen zu können, haben wir optimierte Methoden für die Präparation und Kultivierung von Schweinenetzhautexplantaten sowie für deren Weiterverarbeitung für bildgebende Verfahren entwickelt (Kapitel 4.2).

Dabei zählte es zu unseren Anforderungen, ein diabetisches Netzhautmodell mit möglichst hohem translationalen Wert für die DR im Menschen aufzubauen. In der Schweinenetzhaut gibt es den visual streak, einen Bereich der durch eine hohe Dichte an Ganglienzellen und Zapfen gekennzeichnet ist (Kapitel 4.2.1), (Garcá et al. 2005; Hendrickson and Hicks 2002). Die Region innerhalb des visual streak unmittelbar am Sehnervenkopf weist dabei die höchste Zapfendichte auf und entspricht so dem funktionellen Feinbau der Makula des Menschen (Kleinwort et al. 2017; Chandler et al. 1999; Hendrickson and Hicks 2002). Ein Funktionsverlust der Makula trifft Patienten mit einer DR besonders schwer, da er häufig zur vollständigen Erblindung führt (H. Lee et al. 2019). Unserer Ansicht nach ist die Erforschung pathologischer Mechanismen speziell in diesem Bereich der Netzhaut bei der DR von zentraler Bedeutung. Bei der Modellentwicklung haben wir uns daher auf den Makula-ähnlichen Bereich der Schweinenetzhaut konzentriert. Um den visual streak zuverlässig auffinden zu können, vermittelt unsere Arbeit Kenntnisse über die topographische Anatomie der Neuroretina des Schweines (Kapitel 4.2.1). Wir haben die Schweinenetzhaut durch ein gedachtes Raster in neun Felder unterteilt und diese benannt. Damit kann die Region der Netzhaut, aus der ein Explantat entnommen wird, eindeutig lokalisiert werden. Für das Modell haben wir die Makula-ähnliche

Region aus dem visual streak nasal des Sehnervenkopfs explantiert (Abb. 4.8, Region 2b).

Es gelang uns, eine manipulationsarme Präparationsmethode zu entwickeln, bei der eine korrekte topographische Orientierung im eröffneten Augapfel und somit die gezielte Auswahl von Explantaten aus dem visual streak stets gewährleistet waren (Kapitel 4.2.2, Abb. 4.13). Diese Methode erforderte das Ausschneiden des Explantats aus der zuvor abgelösten Neuroretina, die im intakten Augapfel schwamm und über die feste Verbindung zum Sehnervenkopf in Position gehalten wurde (Abb. 4.10). Hierfür erwies sich das Ausstechen mit einer Biopsiestanze anstelle des herkömmlichen Ausschneidens mit einem Skalpell als praktikabel (Abb. 4.13). Das Ausstechen mit der Stanze ermöglichte eine sehr präzise Auswahl des zu explantierenden Bereichs. Die Manipulation beim Ausstechvorgang war dabei auf ein Minimum reduziert. Die kreisrunde Schnittkante, die beim Ausstechen mit einer Stanze entstand, hatte außerdem entscheidende Vorteile für die weitere Handhabung: Die glatten Schnittländer konnten sich nicht ineinander verhaken und gewährleisteten später ein flächiges Anliegen des Explantats auf der Kulturmembran (Abb. 4.12, Abb. 4.13). Die eckigen Kanten bei der Präparation mit einem Skalpell verhaken sich hingegen häufig ineinander, was die Handhabung deutlich erschwerte und zu eingeschlagenen Rändern beim Ablegen auf der Membran führte. Es ist bekannt, dass ein flaches Aufliegen des Explantats auf der Kulturmembran die Kultivierbarkeit der Schweinenetzhaut verbessert (Taylor et al. 2013). Außerdem beruht das Prinzip der Medium-zu-Luft Kultivierung von Netzhautkulturen auf der ausreichenden Nährstoffversorgung über das Medium sowie auf dem unbehinderten Gasaustausch über die Umgebungsluft (Bull 2011). Dafür ist es unserer Meinung nach essentiell, dass das Netzhautgewebe flach und ohne Überlagerungen auf der Kulturmembran ausgebreitet ist.

Der Transfer des Explantats auf die Kulturmembran mithilfe des oberen Endes einer Glaspasteurpipette hat sich als weiterer sehr praktikabler Schritt erwiesen (Abb. 4.13). Eine Publikation beschreibt den Transfer von Schweinenetzhautexplantaten auf sterilem Filterpapier, woran wir unsere erste Idee des Transfers auf Parafilm anlehnten (Jianfeng Wang et al. 2011). Allerdings erforderte das Ablegen des Explantats auf der Kulturmembran die Manipulation mit Pinzetten. Fast gänzlich ohne Manipulation ist hingegen der Transfer von Mäusenetzhautexplantaten in vorne abgeschnittenen Pinzettenspitzen aus Plastik beschrieben, wobei die Schnittkanten

der Pinzettenspitzen geglättet werden sollten (Gustmann and Dünker 2010). Aufgrund der Größe unserer Explantate (6 mm Durchmesser, festgelegt durch die Größe der Biopsiestanze) kam der Transfer in einer Pinzettenspitze nicht in Frage. Das obere Ende einer Glaspasteurpipette erwies sich dahingegen als genau passend (Abb. 4.12, 4.13). Zudem ist das obere Ende der Pipette nicht verjüngt und die Ränder sind stumpf, sodass beim Aufnehmen des Explantats keinerlei Schaden entstehen kann. Darüber hinaus erwies sich die Transparenz der Glaspipette als äußerst hilfreich für die makroskopische Selektion. Sichtbare Schäden, wie Risse oder Kerben, die bei der bisherigen Präparation entstanden waren, schlossen ein Explantat für die Kultivierung aus. Auch ein Verlust der Photorezeptor-Außensegmente konnte bei ganz genauer Betrachtung als Aufhellung der samtigen Schicht der Photorezeptoren erkannt werden und führte zum Ausschluss des Explantats.

Der größte Gewinn der Glaspipettenmethode bestand darin, sehr praktikabel bestimmen zu können, welche die innere (liegt *in vivo* dem Glaskörper an) bzw. die äußere Oberfläche (liegt *in vivo* dem RPE an) der Netzhautexplantate war (Abb. 4.12A,B). Dies war entscheidend, weil man bei der Kultivierung der Neuroretina zwei Ausrichtungen unterscheidet, das heißt welche Oberfläche der Neuroretina auf der Kulturmembran aufliegt und welche sich an der Luft befindet (Taylor et al. 2014). Lange Zeit war es üblich, die Explantate mit der äußeren Oberfläche und somit mit den Photorezeptoren nach unten auf der Membran zu kultivieren (Murali et al. 2019). Das hatte den Grund, dass so die Photorezeptoren, als der stoffwechselaktivste Zelltyp in der Netzhaut, einen bestmöglichen Zugang zur Nährstoffversorgung über das Medium hatten (Ogilvie et al. 1999). Anhand von Netzhautkulturen der Ratte wurde allerdings bald diskutiert, dass diese Ausrichtung auf der Kulturmembran für die Kultivierung maturer Netzhäute nicht uneingeschränkt empfehlenswert sei (Johnson and Martin 2008). Als Alternativmethode wurden Rattennetzhautexplantate mit der inneren Oberfläche auf der Kulturmembran kultiviert, was die Anheftung auf der Membran und die Kultivierbarkeit deutlich verbesserte (Pinzón-Duarte et al. 2000). Diesem Beispiel folgten Studien an Mäuse- und Schweinenetzhautexplantaten (Xin et al. 2007; Jianfeng Wang et al. 2011; Taylor et al. 2014). Taylor et al. fanden heraus, dass der Erhalt der Morphologie der Schweinenetzhaut nach zehn Tagen *in vitro* von dieser Ausrichtung auf der Kulturmembran deutlich profitierte. Sie begründeten dies mit der Theorie, dass das

Aufliegen der vergleichsweise steifen inneren Neuroretina auf der unelastischen Kulturmembran die gesamte Netzhaut mechanisch stabilisiert (Taylor et al. 2014). Diese Art der Ausrichtung wurde daher als „inner retinal support“ (IRS) bezeichnet (Taylor et al. 2014). Die erreichte Versteifung könnte die im Auge *in vivo* vorherrschenden, biomechanischen Stabilisierungskräfte simulieren (Taylor et al. 2014). Wir selbst konnten beim Erhalt der morphologischen Struktur keine Unterschiede zwischen beiden Methoden der Kultivierung nach drei Tagen *in vitro* feststellen (Abb. 4.16). In Anlehnung an Taylor et al. haben wir für alle nachfolgenden Experimente ausschließlich Explantate in der IRS-Ausrichtung verwendet (Taylor et al. 2014). Ob sich über einen längeren Zeitraum der Kultivierung auch bei uns Unterschiede zwischen beiden Methoden ergeben hätten, können wir nicht beurteilen.

Nachdem wir eine geeignete Präparationsmethode für unsere Schweinenetzhautexplantate entwickelt hatten, musste es uns gelingen, die Neuroretina bestmöglich in Kultur zu erhalten. Wir beschäftigten uns daher detailliert mit einer Optimierung der Kulturbedingungen (Kapitel 4.2.4, Abb. 4.16). Das am häufigsten verwendete Kultivierungsprinzip für Netzhautkulturen unterschiedlicher Spezies ist die Medium-zu-Luft Kultivierung (Kapitel 3.1.2.1.2), (Ying Li et al. 2018). Unter Anwendung des Prinzips der Medium-zu-Luft Kultivierung haben wir einige Modifikationen der Kulturbedingungen für unser Netzhautmodell getestet. Die Evaluierung unserer Modifikationen erfolgte anhand der Beurteilung des Erhalts der Morphologie der kultivierten Netzhäute nach der Fixation (Kapitel 4.2.3).

Bei der Auswahl des Zellkulturmediums (DMEM/F12, Neurobasalmedium) haben wir uns an anderen Studien über Schweinenetzhautexplantate orientiert (Taylor, Arnér, and Ghosh 2016; Di Lauro et al. 2016; Cepeda et al. 2016). Die Idee zur Verwendung von RPMI 1640 Medium stammte aus Veröffentlichungen zu Netzhautexplantaten aus anderen Spezies (Burden-Gulley, Ensslen, and Brady-Kalnay 2002; Oblander et al. 2007). Wir verglichen die Kultivierung mit allen drei Medien mit einer jeweiligen FBS-Konzentration von 10%. Durch die Kultivierung mit RPMI 1640 Medium konnten wir das beste Ergebnis erzielen, was sich insbesondere im vollständigen Erhalt der Photorezeptor-Außensegmente über zwei Tage in Kultur zeigte (Abb. 4.15, 4.16). RPMI 1640 ist das einzige der drei Zellkulturmedien, welches Glutathion enthält (vergleiche Herstellerangaben, Stand November 2019).

Glutathion ist ein wichtiges Antioxidans, das in der Netzhaut von Mäusen natürlich vorkommt (Schultz et al. 2018; Navneet, Zhao, et al. 2019; Navneet, Cui, et al. 2019; Grosche et al. 2016). Jedoch haben Untersuchungen an Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen und auch Primaten gezeigt, dass die Außensegmente von Photorezeptoren nahezu kein Glutathion enthalten (Carter-Dawson et al. 2004; Huster et al. 1998; Schütte and Werner 1998; Pow and Crook 1995). In Übereinstimmung damit haben Untersuchungen im Kaninchen ergeben, dass die Photorezeptor-Außensegmente besonders sensibel auf oxidativen Stress reagieren (Baksheeva et al. 2018). Oxidativer Stress tritt auch in der Schweinenetzhaut durch die Kultivierung auf (Åkerström et al. 2017). In Anlehnung an das Ergebnis aus Kaninchen gehen wir davon aus, dass sich der oxidative Stress in der kultivierten Schweinenetzhaut vor allem auf die Photorezeptor-Außensegmente auswirkt (Baksheeva et al. 2018). Dies könnte die Veränderungen der Photorezeptor-Außensegmente durch Kultivierung mit DMEM/F12 und Neurobasalmedium erklären. Der vergleichsweise sehr gute Erhalt der Photorezeptor-Außensegmente durch Kultivierung mit RPMI 1640 Medium könnte auf eine verbesserte oxidative Stressbewältigung durch das in diesem Medium enthaltene Glutathion zurückzuführen sein. Dass Photorezeptoren in der Lage sind, Glutathion aus dem Medium aufzunehmen, erscheint plausibel, da in der Mäusenetzhaut die Aufnahme von Glutathion aus extraretinalen Quellen beschrieben ist (Trachsel-Moncho et al. 2018). Um die Aufnahme von Glutathion aus dem RPMI 1640 Medium in die Photorezeptor-Außensegmente unserer Netzhautkulturen nach zwei Tagen *in vitro* zu überprüfen, könnte die Expression von Glutathion in bildgebenden Verfahren nachgewiesen werden (B.S. Winkler et al. 2005). Dabei könnte der Vergleich zwischen Explantaten, die mit RPMI 1640 bzw. DMEM/F12 Medium kultiviert wurden, vorgenommen werden. Der Vergleich mit Explantaten, die mit Neurobasalmedium kultiviert wurden, wäre angesichts des großflächigen Verlusts der Photorezeptor-Außensegmente nach zwei Tagen in Kultur nicht sinnvoll. Um anschließend zu überprüfen, ob sich mögliche Unterschiede im Glutathiongehalt auch funktionell auf die oxidative Stressbewältigung auswirken, könnte ein vergleichender Expressionsnachweis von Markern für oxidativen Stress, wie Avidin oder 4-Hydroxynonenal, erfolgen (Trachsel-Moncho et al. 2018). Darüber hinaus könnten weitere Experimente zeigen, ob eine zusätzliche Supplementierung von Antioxidantien, wie Glutathion, in RPMI 1640 Medium den Erhalt der Photorezeptor-

Außensegmente in Schweinenetzhautexplantaten über die Zeit *in vitro* weiter verbessern könnte.

Das gute Ergebnis, das wir bei der Kultivierung mit RPMI 1640 Medium erzielen konnten, hing allerdings vom FBS-Zusatz als der limitierende Faktor für den Erhalt der gesamten Netzhautmorphologie ab (Abb. 4.16). Der Verzicht auf den Zusatz von 10% FBS in das RPMI 1640 Medium führte bereits nach drei Tagen *in vitro* zu einer vollständigen Auflösung der morphologischen Struktur der Netzhautexplantate. Der Verzicht auf FBS beruhte auf der Tatsache, dass Serum als Kulturzusatz bei der Netzhautkultivierung umstritten ist (Murali et al. 2019). Aufgrund der nicht exakt zu definierenden Zusammensetzung gilt es als ein unkontrollierbarer Faktor mit unbekannter Einflussnahme auf Experimente (Murali et al. 2019). Daher gab es immer wieder Versuche, Netzhautexplantate unter serumfreien Bedingungen zu kultivieren, was vor allem für Nagetiernetzhäute hinsichtlich des Erhalts der Morphologie erfolgreich war (Johnson and Martin 2008; Caffé et al. 2001; Alarautalahti et al. 2019). Mäusenetzhautexplantate können bis zu vier Wochen unter serumfreien Bedingungen mit erhaltener morphologischer Struktur kultiviert werden (Caffé et al. 2001). Im Gegensatz zu Netzhautexplantaten aus Nagetieraugen lässt sich die serumfreie Kultivierung für Netzhautexplantate des Menschen nicht anwenden (Murali et al. 2019). Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch für die Schweinenetzhaut von einer serumfreien Kultivierung definitiv abzuraten ist. Das deckt sich mit zahlreichen Berichten über die Kultivierung von Schweinenetzhäuten, in denen, übereinstimmend mit unserem Protokoll, der Zusatz von 10% FBS in das Kulturmedium beschrieben wird (Åkerström et al. 2017; Taylor et al. 2017; Engelsberg and Ghosh 2007; Di Lauro et al. 2016; Ivan Fernandez-Bueno et al. 2008).

Die Notwendigkeit einer Serum-Zugabe bei der Kultivierung von Schweine- und Menschennetzhaut wirft die Frage auf, welche Auswirkungen einzelne Komponenten des Serums auf die Kultur haben. Interessanterweise ist für Menschennetzhautexplantate der Zusatz von Wachstumsfaktoren beschrieben (Murali et al. 2019). Wachstumsfaktoren gehören zu den wichtigsten Inhaltsstoffen von FBS (Arora 2013). Dazu zählen unter anderen der Glial Growth Factor (GGF), der Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und der Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1), wie Analysen der Zusammensetzung von FBS gezeigt haben (Honegger and Humbel 1986; Zheng et al. 2006). Für die genannten Wachstumsfaktoren ist in

Netzhautzellen unterschiedlicher Spezies ein neuroprotektiver Effekt beschrieben (Birmingham-McDonogh, McCabe, and Reh 1996; Traverso et al. 2003; Homma et al. 2007). Ein Zusatz von GGF bzw. bFGF in serumfreies Kulturmedium bewirkt *in vitro* eine deutlich verbesserte Überlebensrate von Ganglienzellen aus Ratten und primären Photorezeptoren aus Schweinen (Traverso et al. 2003; Birmingham-McDonogh, McCabe, and Reh 1996). Die intraokulare Injektion von IGF1 bei einem Rattenmodell für Sehnerventraumata führte zu signifikant verbesserten Überlebensraten der Ganglienzellen (Homma et al. 2007). In Anlehnung an die genannten Studien halten wir es für denkbar, dass die im FBS enthaltenen Wachstumsfaktoren für das Überleben von Nervenzellen in der kultivierten Schweinenetzhaut bedeutend sind. Es liegt nahe, dass sich die potenziell neuroprotektiven Eigenschaften auch positiv auf die gesamte Morphologie der Netzhaut auswirken könnten. Das würde den deutlich besseren Erhalt der morphologischen Netzhautstruktur durch Zusatz von 10% FBS in das Kulturmedium im Vergleich zu einer serumfreien Kultivierung erklären. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob ein experimenteller Zusatz ausgesuchter Wachstumsfaktoren in serumfreies RPMI 1640 Medium den Erhalt der Netzhautmorphologie nach drei Tagen in Kultur gewährleisten kann. GGF, bFGF und IGF1 wären dafür aufgrund ihrer beschriebenen neuroprotektiven Eigenschaften vielversprechende Kandidaten (Birmingham-McDonogh, McCabe, and Reh 1996; Homma et al. 2007; Traverso et al. 2003). Das Ziel könnte die Vermeidung oder zumindest die Reduktion des FBS-Zusatzes in das Kulturmedium sein.

Bei der Kultivierung von Schweinenetzhaut könnte eine Reduktion des FBS-Zusatzes durch negative Effekte auf RMG limitiert sein, da FBS eine besondere Bedeutung für Schweine RMG *in vitro* zu haben scheint (Ruzafa, Pereiro, Lepper, et al. 2018). In Kultur hängen sowohl die Ausprägung der Zellfortsätze primärer Schweine RMG als auch deren Fähigkeit, neuroprotektive Faktoren zu produzieren, von der Konzentration des zugesetzten FBS ab (Ruzafa, Pereiro, Lepper, et al. 2018). Wir halten es für wahrscheinlich, dass sich diese Erkenntnisse aus isolierten Schweine RMG auch auf RMG in unserem Schweinenetzhautmodell übertragen lassen. Damit wäre es denkbar, dass sich gut ausgeprägte RMG-Fortsätze sowie ein hohes Maß an Neuroprotektion positiv auf den morphologischen Erhalt unserer Netzhautexplantate auswirken könnten. Dies würde indirekt den positiven Effekt von FBS auf die Netzhautmorphologie nach drei Tagen in Kultur erklären. Um die

Ausprägung von RMG-Fortsätzen in unseren Netzhautkulturen in Abhängigkeit von der FBS-Konzentration zu ermitteln, könnten RMG morphologisch untersucht werden. Dazu ist in der Schweinenetzhaut der Expressionsnachweis von Vimentin als RMG-Marker beschrieben (Hurst et al. 2017). Für dieses Experiment sollten verschiedene FBS-Konzentrationen ausgetestet werden, die wenn möglich unter 10% liegen, aber nicht zum vollständigen Auflösen der Netzhautmorphologie führen. Auch die mögliche Abhängigkeit des RMG-vermittelten neuroprotektiven Potentials von der FBS-Konzentration im Kulturmedium könnte so ermittelt werden. Dazu könnte ein vergleichender Expressionsnachweis von neuroprotektiven Faktoren erfolgen. Kandidaten könnten dabei Faktoren sein, die unsere Gruppe durch proteomische Analysen des Zellkulturüberstands von primären Schweine RMG detektiert hat, wie Transferrin, Clusterin oder Basigin (Ruzafa, Pereiro, Lepper, et al. 2018; von Toerne et al. 2014).

Ein Ziel beim Ersatz von FBS bei der Kultivierung von Schweinenetzhautexplantaten wäre der Zusatz möglichst weniger, chemisch klar definierter Substanzen (van der Valk et al. 2010). Zu diesem Zweck sind chemisch definierte Kulturzusätze erhältlich (van der Valk et al. 2010). Durch deren definierte Zusammensetzung werden ungewollte und unbekannte Einflüsse auf Experimente verhindert (van der Valk et al. 2010). Sollten zukünftige Untersuchungen zeigen, dass es die positiven Effekte auf RMG sind, die den FBS-Zusatz in das Kulturmedium von Schweinenetzhautexplantaten erforderlich machen, könnten chemisch definierte Zusätze speziell für die Bedürfnisse von Gliazellen angewandt werden. Sie könnten ähnlich positive Effekte auf diesen Zelltyp und somit auf die gesamte Netzhaut in Kultur ausüben. Der Einsatz eines chemisch definierten Zusatzes basierend auf der Bottenstein G5 Rezeptur ist zu diesem Zweck in Mäusenetzhautexplantaten beschrieben (Toops et al. 2012). Dabei handelt es sich um eine klar definierte Rezeptur, die speziell für die Kultivierung von Gliazellen unter serumfreien Bedingungen entwickelt wurde (Michler-Stuke, Wolff, and Bottenstein 1984). Die Beurteilung des morphologischen Erhalts von Schweinenetzhautexplantaten nach drei Tagen in Kultur könnte zeigen, ob der Zusatz von Bottenstein G5 in serumfreies RPMI 1640 Medium eine gleichwertige Alternative zum FBS-Zusatz darstellt.

Die Ko-Kultur der Neuroretina mit anderen Netzhautzellen war ein weiterer Aspekt, den wir beim Aufbau unseres Netzhautmodells betreffend möglicher Effekte auf die

Netzhautmorphologie untersuchten (Abb. 4.16). Die Idee einer Ko-Kultivierung beruht auf der Tatsache, dass die Netzhaut ein permanent mit sich selbst und mit der Umgebung interagierendes, zelluläres Netzwerk darstellt (Elena Vecino et al. 2016). Das RPE spielt bei diesen Interaktionen eine bedeutende Rolle (Strauss 2005).

Um potenziell positive Effekte des RPE auf die Neuroretina in Kultur zu untersuchen, stellen Di Lauro et al. ein Modell für die Ko-Kultivierung der Schweineneuroretina mit Schweine RPE vor (Di Lauro et al. 2016). Sie präparieren dafür dissoziiertes, primäres RPE, das zu einem Monolayer heranwächst (Di Lauro et al. 2016). Die Neuroretina wird nach dem Prinzip der Medium-zu-Luft Kultivierung auf einer Kulturmembran kultiviert, wobei sich auf dem Boden der Kulturplatte das RPE befindet, sodass eine räumlich getrennte Ko-Kultur entsteht (Di Lauro et al. 2016). Di Lauro et al. beschreiben einen signifikant besseren Erhalt der neuroretinalen Morphologie durch Ko-Kultur mit RPE im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nach neun Tagen in Kultur (Di Lauro et al. 2016). Aus dieser Publikation haben wir den experimentellen Aufbau für unseren Versuch übernommen (Di Lauro et al. 2016). Nach vier Tagen in Kultur konnten wir keinen Effekt der Ko-Kultivierung von Neuroretina und RPE auf den Erhalt der morphologischen Struktur im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Wir halten es für möglich, dass ein positiver Effekt auf den Erhalt der Netzhautmorphologie erst nach einem längeren Zeitraum *in vitro* auftritt, was durch ein weiterführendes Experiment untersucht werden könnte.

Unabhängig von den Effekten auf den morphologischen Erhalt könnte dieses Ko-Kulturmodell zukünftig für spezielle Untersuchungen zur Netzhautablösung interessant sein (Di Lauro et al. 2016). Die Lauro et al. beschreiben das Modell hierfür als besonders geeignet, da die räumliche Trennung der Neuroretina vom RPE den Zustand einer Netzhautablösung *in vivo* simuliert (Di Lauro et al. 2016). Eine Netzhautablösung tritt auch bei der DR als eine schwerwiegende Komplikation auf (D. Q. Li and Choudhry 2018). In unserem Modell könnte die Ko-Kultur mit RPE den Aspekt der Netzhautablösung bei der DR simulieren. So könnte das Modell hinsichtlich der Abbildung dieser Komplikation erweitert werden.

Da wir unsere Netzhautkulturen als diabetisches Netzhautmodell für die Verifizierung von SPP1 in bildgebenden Verfahren verwenden wollten, haben wir uns intensiv mit einem geeigneten Protokoll für die Fixation, Einbettung und Schnitterstellung von Netzhautexplantaten beschäftigt (Kapitel 4.2.5, Abb. 4.20).

Bei der Fixation mit PFA, einem additiven Fixanz, kommt es primär zur Anlagerung an Proteine und sekundär zu deren chemischer Vernetzung (Stradleigh and Ishida 2015). Die reversible Vernetzung von Proteinen führt zur Stabilisierung der Gewebestruktur, wodurch Schäden durch die Weiterverarbeitung vermieden werden (Stradleigh and Ishida 2015). Die Netzhaut ist ein sehr empfindliches Gewebe, das durch inadäquate Fixation leicht zu Schaden kommt (Stradleigh and Ishida 2015).

In der Literatur wird die Fixation von Retinaexplantaten unterschiedlicher Spezies mit PFA 4% beschrieben, wobei die Zeitdauer von 30 Minuten bis zu einem Tag variiert und die Temperatur zwischen 4 °C und Raumtemperatur liegt (Smedowski et al. 2018; Åkerström et al. 2017; Alarautalahti et al. 2019; Müller et al. 2017; Kobuch et al. 2008). Diese Variationen machen deutlich, dass für die Fixation der Netzhaut keine definitiven Empfehlungen bestehen (Stradleigh and Ishida 2015).

Für unsere Fixationsversuche haben wir eine Fixationsdauer von drei Stunden und eine Temperatur von 4 °C gewählt. Entscheidend war unserer Erfahrung nach, an welche Stellen und in welcher Menge die Zugabe des PFA erfolgte (Abb. 4.20). Beim schrittweisen Herantasten an die beste Methode orientierten wir uns an den wenigen Publikationen über Netzhautexplantate aus anderen Spezies, die Informationen über den Zugabeort und die Fixanzmenge enthalten (Kechad et al. 2012; Peynshaert et al. 2017; Johnson and Martin 2008). Dabei konnten wir ein befriedigendes Fixationsergebnis im Hinblick auf eine erhaltene Netzhautmorphologie nach der Fixation erst erreichen, als wir die Explantatoberfläche vollständig mit PFA bedeckten und zusätzlich PFA von unterhalb der Kulturmembran zugaben (Abb. 4.17).

Als Erklärungen für eine unzureichende Fixation bei unseren Fixationsversuchen ziehen wir die zwei folgende Aspekte in Betracht: (a) Die Menge des Fixanz reichte nicht aus, um das gesamte Gewebe zu penetrieren und dadurch kam es zur unzureichenden Stabilisierung der Gewebestruktur (trifft auf das alleinige Benetzen der Explantate zu), (Stradleigh and Ishida 2015). (b) Durch das PFA selbst könnte es zu hyperosmolare Schäden am Gewebe gekommenen sein (etwa dann, wenn die Fixationswirkung aufgrund einer zu geringen Fixanzmenge unzureichend war), (Stradleigh and Ishida 2015).

Aus den fixierten Netzhautexplantaten wollten wir qualitativ hochwertige Netzhautschnitte erstellen. Unser Anspruch an die Netzhautschnitte war, dass sie geradlinig auf dem Objektträger lagen und möglichst exakt den 90° Querschnitt der Netzhaut repräsentierten. Beide Qualitätsmerkmale ließen sich erreichen, indem alle

Arbeitsschritte der Fixation, Entwässerung und Einbettung mitsamt der am Explantat haftenden Kulturmembran durchgeführt wurden (Abb. 4.19, 4.20). Die glättende Membran gewährleistete dabei glatte Explantate, die praktikabel im OCT-Block positioniert werden konnten. Um eine dauerhafte Explantat-Membran-Anheftung in allen Arbeitsschritten zu erreichen, erwies sich die tropfenweise Zugabe von PFA auf die Explantatoberfläche im Insert in Kombination mit der Entwässerung der ausgestochenen Explantat-Membran-Kombination in Biopsiekapseln als hilfreich. Die Verwendung von Einbettformen ermöglichte es, die Netzhautexplantate mit exakt paralleler Ausrichtung im OCT-Block zu positionieren. Anschließend konnte der quaderförmige Block so auf dem Probenhalter des Kryostats platziert werden, dass die Schnittkante exakt im rechten Winkel zum Block lag. Die parallele Ausrichtung der Netzhaut im Block sowie der Schnitt im 90° Winkel zum Block gewährleisteten ein exakt im Querschnitt getroffenes Schnittbild.

Nachdem die Etablierung von Schweinenetzhautexplantaten abgeschlossen war, diente das Netzhautmodell der weiterführenden Untersuchung von SPP1 als Kandidat aus unserem RMG-Diabetesmodell (Kapitel 4.1.2, 4.1.4, 4.1.7). Wir untersuchten das SPP1-Expressionsmuster in der kultivierten Schweinenetzhaut mittels immunhistologischer Färbungen (Kapitel 4.3.1). Es zeigte sich ein bisher unbekanntes, RMG-assoziiertes Muster in der Nervenfaserschicht (Abb. 4.21). Anhand dieses Expressionsmusters konnten wir RMG in der Schweinenetzhaut als Quelle der SPP1-Expression identifizieren.

In Schweinenetzhautexplantaten unter diabetischen Kulturbedingungen konnten wir einen Verlust der RMG-assoziierten SPP1-Expression in der Nervenfaserschicht zeigen (Abb. 4.21). Mit diesem Ergebnis konnte die RMG-vermittelte SPP1-Expressionsminderung auch in einem komplexeren Diabetesnetzhautmodell bestätigt werden. Die SPP1-Expressionsminderung ist eine bisher unbekannte Veränderung in RMG in einem diabetischen Kontext (Pubmed-Recherche: Stand 29. November 2019). Sie ist besonders interessant, da SPP1 in der Ratte einen Einfluss auf die Volumenregulation von RMG hat (Wahl et al. 2013). Die Volumenregulation befähigt RMG zur gezielten Flüssigkeitsabgabe bei steigendem Zellvolumen und wurde in zahlreichen *in vitro* Studien an Säugetier RMG nachgewiesen (Fernández et al. 2013; Wahl et al. 2013; Vogler et al. 2016). Sie ist Teil der wichtigen Aufgabe von RMG, die Flüssigkeitsmenge im Extrazellularraum zu regulieren (Bringmann et al.

2006). RMG müssen konstant den Extrazellularraum dehydrieren, indem sie Flüssigkeit, die im Rahmen des zellulären Stoffwechsels entsteht, in sich aufnehmen (Bringmann et al. 2006). Die gezielte Flüssigkeitsabgabe schützt die RMG anschließend vor einer Ödematisierung (Fernández et al. 2013; Vogler et al. 2016; Wahl et al. 2013). Eine experimentelle Zugabe von SPP1 zu frisch isolierten Netzhautschnitten aus Ratten verbessert die Volumenregulation von RMG erheblich (Wahl et al. 2013). Sogar unter massiver Herausforderung der Volumenregulation durch experimentell induziertes osmotisches Anschwellen können RMG sich bei Zugabe von SPP1 vor einer Ödematisierung schützen (Wahl et al. 2013). Wir ziehen daraus den Schluss, dass ein Rückgang der endogenen SPP1-Expression in RMG infolge diabetischer Bedingungen möglicherweise eine Verschlechterung der Fähigkeit zur Volumenregulation bewirkt. Dies könnte zur Ödematisierung von RMG bei Diabetes mellitus führen. Es ist bekannt, dass ödematisierte RMG (intrazelluläres Ödem) ihre Aufgabe der Flüssigkeitsregulation nicht mehr erfüllen können, was zum extrazellulären Ödem beiträgt (Bringmann, Reichenbach, and Wiedemann 2004). Passend zu dieser Hypothese hat unsere Gruppe ein zentrales Netzhautödem im diabetischen Schweinmodell festgestellt (Kleinwort et al. 2017). Die SPP1-Expressionsminderung könnte entscheidend an dem Mechanismus beteiligt sein, der zur Entstehung des Netzhautödems bei den diabetischen Schweinen führt. Dabei würden RMG schon in einem sehr frühen Stadium Einfluss auf diese wichtige Pathologie nehmen. Hinzu kommt, dass das zentrale Ödem im Schwein in der Nervenfaserschicht auftritt, also exakt in dem Bereich, in dem die RMG-assoziierte SPP1-Expressionsminderung bei den hier durchgeführten Experimenten vorlag (Abb. 4.21), (Kleinwort et al. 2017). Daher ist es denkbar, dass die verminderte SPP1-Expression nicht nur indirekt (über eine Ödematisierung von RMG und folglich den Zusammenbruch der Flüssigkeitshomöostase), sondern auch direkt zum Ödem in der Nervenfaserschicht beiträgt. Um unsere Annahmen zu überprüfen, könnten weitere Experimente an Netzhautkulturen aus Schweinen erfolgen. Beispielsweise könnte die Ödematisierung von RMG bzw. der Nervenfaserschicht in Netzhautexplantaten experimentell induziert und dabei Explantate unter diabetischen Bedingungen mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Die Auswertung könnte mikroskopisch erfolgen. Die gezielte, Antikörper-basierte Blockade von SPP1 in den Kontrollexplantaten könnte dann beweisen, dass es sich um einen spezifisch mit SPP1 assoziierten Mechanismus handelt.

Die Ödempathogenese in den diabetischen Schweinen aufzuklären ist eine vielversprechende Chance, um das Makulaödem des Menschen zu erforschen. Denn die diabetischen Schweine bilden als Alleinstellungsmerkmal unter allen Tiermodellen ein zentrales Ödem aus, welches durch seine Lokalisation im Makula-ähnlichen Bereich der Schweinenetzhaut eindeutige Parallelen zum Makulaödem im Menschen zulässt (Kleinwort et al. 2017). Wenn der vermutete Mechanismus tatsächlich derart früh im Krankheitsgeschehen passiert, ist eine gezielte Untersuchung im Mensचनाuge schwierig. Dazu müssten Augen von frisch diagnostizierten Diabetikern zur Verfügung stehen, die ein Vorstadium des Makulaödems zeigen. Umso wichtiger ist die Erforschung am Schweinemodell, da ein Zugang zu Probenmaterial in jedem Krankheitsstadium möglich ist. Unser diabetisches Netzhautmodell könnte einen wichtigen Beitrag leisten, um die Vorgänge im Schwein besser zu verstehen. Wenn die RMG-assoziierte SPP1-Expressionsminderung tatsächlich an der Pathogenese des Ödems beteiligt wäre, würde dies ein enormes Potential für eine präventive Beeinflussung bergen. Die SPP1-Expression in RMG aufrecht zu erhalten, könnte dabei einen vielversprechenden Ansatz darstellen.

Neben dem möglichen Einfluss auf die Ödementstehung war die SPP1-Expressionsminderung biologisch besonders interessant, da die Zugabe von SPP1 auf Mäusenetzhautexplantate *in vitro* einen neuroprotektiven Effekt ausübt (Del Río et al. 2011). Der neuroprotektive Mechanismus beruht vermutlich auf einer SPP1-induzierten Autostimulation von RMG, die dann zur Überexpression weiterer neuroprotektiver Zytokine führt (Del Río et al. 2011). Wir schließen daraus, dass eine Abnahme der Expression von SPP1 in RMG zu einer schwächeren Autostimulation neuroprotektiver Prozesse führt. Es wäre denkbar, dass dieser Mechanismus bei der DR im Zusammenhang mit neurodegenerativen Prozessen steht. Der Verlust RMG-vermittelter Neuroprotektion könnte so zu neuronalen Schäden bei der DR beitragen. Dabei wären die Auswirkungen deshalb so verheerend, weil RMG im Mausmodell die Hauptquelle neuroprotektiver Signale sind, auch bei Diabetes mellitus (Fu et al. 2015). Weitere Untersuchungen in unserem Netzhautkulturmodell könnten zeigen, inwieweit eine verminderte SPP1-Expression unter diabetischen Kulturbedingungen tatsächlich Auswirkungen auf das Überleben von Nervenzellen hat. Dazu könnte ein vergleichender Nachweis des Untergangs von Nervenzellen in Netzhautexplantaten mittels der TUNEL-Methode erfolgen (Kaempfer et al. 2008). Dabei könnten

Netzhautexplantate unter diabetischen Kulturbedingungen im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollbedingung analysiert werden. In Anlehnung an die Untersuchungen zur SPP1-induzierten Ödematisierung könnte die gezielte, Antikörper-basierte Blockade von SPP1 in den Kontrollexplantaten dann bestätigen, ob es sich um einen spezifisch mit SPP1 assoziierten Mechanismus handelt.

Interessanterweise hat unsere Gruppe eine signifikante Verminderung der RMG-assoziierten SPP1-Expression in der Retina von Pferden mit Uveitis beschrieben (Deeg et al. 2011). Dies könnte darauf hindeuten, dass eine SPP1-Expressionsminderung generell an pathologischen Prozessen der Netzhaut beteiligt ist. Wir nehmen an, dass die Gemeinsamkeit zwischen den Pferdenetzhäuten und unserem Diabetesmodell in einer Aktivierung der RMG (Gliose) liegt. Denn sowohl bei den Pferden als auch im vorliegenden proteomischen Datensatz gab es Hinweise darauf, dass eine Aktivierung von RMG stattgefunden hat (Deeg et al. 2011). Die RMG-Gliose kann zur veränderten Expression von Proteinen führen (Hauck et al. 2007; Eberhardt et al. 2011). Wir stellen die Hypothese auf, dass SPP1 ein weiteres Protein ist, dessen Expression in RMG im Kontext der Gliose verändert wird. Gliose ist eine Reaktion von RMG auf jegliche Form von pathogenen Reizen (Graca, Hippert, and Pearson 2018). Eigentlich stellt sie den zellulären Versuch dar, die Netzhaut vor weiteren Schäden zu schützen (Graca, Hippert, and Pearson 2018). Allerdings ist bekannt, dass sie ebenso schädliche Einflüsse nehmen kann (Graca, Hippert, and Pearson 2018). Übereinstimmend mit der schädlichen Komponente haben Untersuchungen im diabetischen Mausmodell gezeigt, dass die RMG-Gliose maßgeblich an neurodegenerativen Prozessen bei Diabetes mellitus beteiligt ist (C. Liu et al. 2016). Unserer Ansicht nach könnten die beobachteten neurodegenerativen Effekte der RMG-Gliose im Mausmodell dadurch erklärt werden, dass die Gliose möglicherweise mit einer SPP1-Expressionsminderung einhergeht und diese wiederum zu einem Verlust von RMG-vermittelter Neuroprotektion führt. Dieser Mechanismus könnte eine Gliose-induzierte Neurodegeneration nicht nur bei der DR, sondern bei allen, mit einer Gliose einhergehenden, Krankheitsprozessen erklären. Damit bekäme die SPP1-Expressionsminderung in RMG als genereller Mechanismus infolge pathogener Reize eine extrem wichtige Bedeutung für sämtliche neurodegenerative Prozesse der Netzhaut.

Unsere neuroretinalen Kulturen haben sich als ein geeignetes Modell erwiesen, um die SPP1-Expression unter diabetischen Kulturbedingungen auf Gewebeebene zu verifizieren (Kapitel 4.3). Um unser Netzhautmodell auch für die Anwendung in weiteren Fragestellungen zu etablieren, wollten wir Kenntnisse über die durch Kultivierung hervorgerufenen Veränderungen sammeln. Zu diesem Zweck haben wir eine Charakterisierung der Netzhautexplantate an vier Zeitpunkten innerhalb von 14 Tagen Kultivierungsdauer im Vergleich zu frischer Netzhaut durchgeführt (Kapitel 4.4). Dabei haben wir ausschließlich Explantate aus dem visual streak, aus der Region 2b der Schweinenetzhaut, untersucht (Kapitel 4.2.1). Wir halten es für möglich, dass sich dieser Bereich der Schweinenetzhaut aufgrund der spezifischen zellulären Zusammensetzung bei der Kultivierung anders entwickelt als die übrigen Bereiche der Netzhaut (Hendrickson and Hicks 2002; E. Vecino et al. 2004). Daher sind die im Folgenden diskutierten Ergebnisse nicht zwingend auf Explantate anderer Regionen der Schweinenetzhaut übertragbar.

Die durch die Kultivierung hervorgerufenen Veränderungen charakterisierten wir zunächst anhand des Erhalts der morphologischen Struktur. Dies erfolgte in Anlehnung an zahlreiche Studien über Schweinenetzhautexplantate, die eine Beurteilung der Modelle mithilfe morphologischer Gesichtspunkte beschreiben (Rettinger and Wang 2018; Taylor et al. 2014; Kobuch et al. 2008; Di Lauro et al. 2016; J. Winkler et al. 2002; Ivan Fernandez-Bueno et al. 2008; Engelsberg and Ghosh 2007). Die Evaluierung erfolgte unter anderen nach den Kriterien „Definierbarkeit der einzelnen Netzhautschichten“ und „Erhalt der Photorezeptor-Außensegmente“ (Kapitel 4.2.3).

Wir erreichten den Erhalt der neuroretinalen Schichtung über mindestens neun Tage in Kultur (Kapitel 4.4.1, Abb. 4.22). Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Kooperationspartner, welche uns initial das Protokoll für die Arbeit mit Schweinenetzhautkulturen zur Verfügung gestellt haben (Taylor et al. 2014). Dabei beschreiben Taylor et al. eine erhaltene Netzhautschichtung nach 10 Tagen in Kultur (Taylor et al. 2014). Bemerkenswert ist, dass dieses Ergebnis von der IRS-Ausrichtung der Explantate auf der Kulturmembran abhängt, bei der die innere Neuroretina dieser aufliegt (Taylor et al. 2014). Dahingegen weisen gegenteilig ausgerichtete Explantate deutliche strukturelle Schäden zum selben Zeitpunkt der Kultivierung auf (Taylor et al. 2014). Dementsprechend sind auch von anderen Autoren, die Schweinenetzhautexplantate über zehn Tage *in vitro* mit den

Photorezeptoren nach unten auf der Membran kultivieren, keine vergleichbaren Ergebnisse beschrieben (Di Lauro et al. 2016). In Anlehnung an Taylor et al. haben wir für die Charakterisierung über 14 Tage ausschließlich Explantate in der IRS-Ausrichtung untersucht. Wir halten es für wahrscheinlich, dass unser gutes Ergebnis auf diese Art der Kultivierung zurückzuführen ist.

Neben der Netzhautschichtung waren wir am Erhalt der Photorezeptoren interessiert, da sie die empfindlichsten Zellen der Netzhaut sind (Kapitel 4.4.2), (Stone et al. 1999). Degeneration und Verlust von Photorezeptoren sowie insbesondere von deren Außensegmenten sind häufige Veränderungen in Netzhautexplantaten aus verschiedenen Spezies (Alarautalahti et al. 2019; Müller et al. 2017; Di Lauro et al. 2016; Taylor et al. 2014; Kobuch et al. 2008). Da wir speziell Explantate aus der zapfenreichen Region der Schweineretina untersucht haben, waren wir besonders am Zustand der Zapfen über die Zeit *in vitro* interessiert. Der Expressionsnachweis von Cone Arrestin erlaubte uns dabei die morphologische Beurteilung der Zapfen (Abb. 4.23). Die synaptischen Endigungen der Zapfen blieben über mindestens neun Tage erhalten. Dieses Ergebnis bestätigte vorangegangene Untersuchungen in der Schweinenetzhaut *in vitro* (Fontainhas and Townes-Anderson 2011; Iván Fernandez-Bueno et al. 2012). An Tag 9 in Kultur kam es zu einer deutlichen Deformation der Zapfen-Innensegmente sowie zum großflächigen Verlust der Außensegmente. Dieses Ergebnis deckt sich mit ähnlichen Untersuchungen zur Morphologie der Zapfen in Netzhautkulturmodellen aus Mensch und Maus (Iván Fernandez-Bueno et al. 2012; Müller et al. 2017).

Photorezeptor-Außensegmente sind aus Scheibchen aufgebaut, die *in vivo* einer ständigen Abstoßung und Erneuerung unterliegen (Kocaoglu et al. 2016). In Abwesenheit des RPE ist dieser Vorgang *in vitro* nicht möglich und das fehlende Recycling führt schlussendlich zur Degeneration der gesamten Photorezeptorzelle (Müller et al. 2017). Unserer Recherche nach liegen keine Daten zur *in vivo* Umsatzrate von Photorezeptor-Außensegmenten in der Schweinenetzhaut vor (Pubmed-Recherche: Stand 29. November 2019). Bei Primaten hat ein einzelnes Photorezeptor-Außensegment eine Umsatzrate von zehn Tagen, das heißt in diesem Zeitraum wird es *in vivo* einmal komplett abgestoßen und erneuert (Strauss 2005; Young 1971). Wir halten es für denkbar, dass der Verlust von Zapfen-Außensegmenten in unseren Schweinenetzhautexplantaten nach spätestens neun

Tagen in Kultur der physiologischen Überlebensdauer eines Außensegments entspricht, welches *in vitro* nicht erneuert werden kann.

Der am neunten Tag in Kultur beobachtete, großflächige Verlust von Zapfen-Außensegmenten ist ein limitierender Faktor für spezielle Untersuchungen an Zapfen in unserem Netzhautmodell. Da sich die Zapfen zwischen den Untersuchungen an Tag 6 und Tag 9 stark verändert haben, sollten weitere Experimente zeigen, ob die Obergrenze für morphologisch intakte Zapfen an Tag 6, 7 oder 8 erreicht ist. Zudem könnte der Nachweis eines spezifischen Markers für Stäbchen zeigen, ob für diesen Photorezeptor-Zelltyp ähnliche Restriktionen bezüglich der Kultivierungsdauer gelten. In der Schweinenetzhaut ist Rhodopsin als spezifischer Marker für Stäbchen beschrieben (Johansson, Eftekhari, and Warfvinge 2010).

Eine weitere Struktur, die wir auf den Erhalt über die Zeit *in vitro* untersuchen wollten, waren die Nervenzellfortsätze. Die Präparation von Netzhautexplantaten geht unweigerlich mit einer Axotomie einher (Fisher et al. 2005; Alarautalahti et al. 2019; Murali et al. 2019). Die Axotomie führt in der kultivierten Rattennetzhaut zur raschen Degeneration der Ganglienzellfortsätze, was letztlich die Degeneration der gesamten Ganglienzelle (RGC) bewirkt (Nadal-Nicolás et al. 2015). Um den Zustand der RGC-Fortsätze in unserem Schweinenetzhautmodell über die Zeit *in vitro* zu charakterisieren, haben wir die Expression von NEFH untersucht (Kapitel 4.4.5). NEFH haben wir aus praktischen Gründen als Vertreter der Neurofilamente ausgewählt, da uns ein geeigneter Antikörper für immunhistologische Färbungen auf der Schweinenetzhaut zur Verfügung stand (Kleinwort et al. 2017).

Die NEFH-Expression blieb in Axonbündeln der Nervenfaserschicht über 14 Tage in Kultur erhalten (Abb. 4.27). Hingegen ging die Expression in horizontal verlaufenden Nervenzellfortsätzen in der äußeren plexiformen Schicht nach neun Tagen in Kultur fast vollständig verloren. Zu einem ähnlichen Befund kamen auch Johnson et al. bei ihren Expressionsstudien über Neurofilamentmarkerproteine in Netzhautexplantaten aus dem Menschen über 14 Tage in Kultur (Johnson and Martin 2008). Die Autoren bewerteten die anhaltende Expression in der Nervenfaserschicht als Indikator für intakte Axonbündel (Johnson and Martin 2008). Der Verlust der NEFH-Expression würde hingegen für eine Degeneration der Nervenzellfortsätze sprechen (J. Winkler et al. 2002). Intakte Axonbündel in Schweine- und Menschennetzhautexplantaten nach 14 Tagen in Kultur sind unserer Ansicht nach ein Hinweis auf eine langsame

Degeneration der RGC-Fortsätze und damit der RGC selbst. Um die Degeneration dieser Zellen *in vitro*, beispielsweise infolge eines Pathogens, untersuchen zu können, ist es von Vorteil, wenn die kulturinduzierte Degeneration möglichst langsam fortschreitet (Niyadurupola et al. 2011). Um die potenzielle Eignung unseres Schweinenetzhautmodells für solche Studien über die RGC-Degeneration zu evaluieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. Dazu könnte anhand des Expressionsnachweises von Neuronal Nuclei Protein, das in der Schweinenetzhaut als RGC-Marker beschrieben ist, sowie mithilfe der TUNEL-Methode der Zustand von RGC in Netzhautexplantaten über 14 Tage *in vitro* bewertet werden (Johansson, Eftekhari, and Warfvinge 2010; Kaempf et al. 2008). Eine aktuelle Studie stellt ein Verfahren zur funktionellen Beurteilung von RGC in Mäusenetzhautexplantaten vor (Alarautalahti et al. 2019). Mithilfe eines Mikroelektroden-Arrays kann die Aktivität von RGC gemessen werden, indem ein chemisches Potential in ein elektrisches Signal umgewandelt und an den Elektroden detektiert wird (Alarautalahti et al. 2019). Solche Verfahren könnten es zukünftig ermöglichen, den funktionellen Erhalt von RGC in unserem Netzhautmodell direkt zu beurteilen.

Die Expression bzw. die Expressionsänderung von funktionellen Proteinen in RMG konnte uns Aufschluss darüber geben, welchen Veränderungen dieser Zelltyp durch Kultivierung im intakten Zellverbund unterworfen ist (Kapitel 4.4.3, 4.4.4). Isolierte Schweine RMG erfahren durch eine Kultivierung von 14 Tagen eine Dedifferenzierung (Hauck, Suppmann, and Ueffing 2003). Diese ist beispielsweise durch den Expressionsverlust von Glutamin Synthetase (GS) gekennzeichnet (Hauck, Suppmann, and Ueffing 2003). GS ist ein RMG-spezifisches Enzym, das die Umwandlung von Glutamat zu Glutamin katalysiert (Lin et al. 2018). Der aus dem synaptischen Spalt in die RMG aufgenommene Neurotransmitter Glutamat kann dadurch den Nervenzellen in Form von Glutamin, einem Vorläufer von Glutamat, erneut zur Verfügung gestellt werden (Lin et al. 2018). Anders als bei den isolierten RMG blieb die Expression von GS in unseren Schweinenetzhautkulturen über 14 Tage *in vitro* erhalten (Abb. 4.24). In den Netzhautkulturen ist die anhaltende GS-Expression vermutlich auf den Erhalt glia-neuronaler Interaktionen zurückzuführen, wie es schon Untersuchungen an Ratten RMG *in vitro* gezeigt haben (Heidinger et al. 1999). Die erhaltene Expression eines funktionell bedeutenden Enzyms deutet darauf hin, dass selbst nach 14 Tagen in Kultur noch eine anhaltende Differenzierung von RMG vorliegt. Damit wird deutlich, dass die Beibehaltung des

differenzierten Zustands von RMG *in vitro* von einem intakten Umfeld abhängt. Es liegt daher nahe, dass sich RMG im Netzhautmodell näher an der *in vivo* Situation befinden und daher näher an der *in vivo* Situation untersucht werden können als isolierte RMG.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass es in unserem Netzhautmodell zu einer zunehmenden GFAP-Expression über 14 Tage in Kultur kam (Abb. 4.25). Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien über Schweinenetzhautexplantate überein, die eine zunehmende GFAP-Expression als Marker einer kulturinduzierten RMG-Gliose beschreiben (J. Winkler et al. 2002; Ivan Fernandez-Bueno et al. 2008). In unserem Modell ergaben sich noch weitere Hinweise auf eine Aktivierung von RMG. Über den Nachweis von GFAP und dem RMG-spezifischen Marker CRALBP zeigte sich nach 14 Tagen *in vitro* verglichen mit frischer Retina eine Hypertrophie radiärer RMG-Fortsätze (Abb. 4.26). Die Hypertrophie kann ebenfalls auf eine Gliose zurückgeführt werden und wurde zuvor in Rattennetzhautexplantaten beschrieben (Kuhrt et al. 2008; Bringmann and Wiedemann 2012). Zudem kam es zum Einwachsen von RMG-Fortsätzen in die äußere Grenzmembran nach 14 Tagen in Kultur (Abb. 4.26). Dieser Befund ist mehrfach in Schweinenetzhautkulturen als Konsequenz der Kultivierung beschrieben (J. Winkler et al. 2002; Ivan Fernandez-Bueno et al. 2008; Di Lauro et al. 2016). Auch hier wird ein Zusammenhang mit der Gliose von RMG angenommen (J. Winkler et al. 2002). Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass es zu einer kulturinduzierten RMG-Gliose im Schweinenetzhautmodell kommt. Dieser Aspekt sollte unserer Meinung nach berücksichtigt werden, wenn RMG-spezifische Vorgänge in Schweinenetzhautexplantaten untersucht werden. Demnach wäre es nicht zielführend, in Netzhautexplantaten eine RMG-Reaktion zu erwarten, wie sie in der gesunden Netzhaut *in vivo* passiert. Dafür könnten RMG in unserem Netzhautmodell aber möglicherweise in einer Stresssituation untersucht werden, die auch in sämtlichen pathologischen Prozessen der Netzhaut *in vivo* auftritt und daher gerade für die Untersuchung pathologischer Zustände interessant ist. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich die Mechanismen, die die RMG-Gliose auslösen, *in vivo* und *in vitro* unterscheiden könnten. Kuhrt et al. fanden heraus, dass die RMG-Gliose, die durch die Kultivierung von Rattennetzhaut hervorgerufen wird, die RMG-Gliose nach einer Ischämie *in vivo* imitiert (Kuhrt et al. 2008). In diesem Fall liegt es nahe, dass die Kultivierung die Netzhaut in einen ischämischen Zustand versetzt und dass

daher auch die auslösenden Mechanismen der RMG-Gliose ähnlich sind (Kobuch et al. 2008). Inwieweit die kulturinduzierte RMG-Gliose in unserem Netzhautmodell gliotische Prozesse *in vivo* bei anderen Netzhautpathologien, wie der DR, abzubilden vermag, bliebe genauer zu untersuchen. Dazu könnten in unserem Netzhautmodell die Veränderungen in RMG über die Zeit in Kultur durch proteomische Analysen charakterisiert werden. Unsere Gruppe hat das bereits mit Erfolg im Rahmen der equinen rezidivierenden Uveitis vorgenommen (Hauck et al. 2010; Eberhardt et al. 2011). Um die molekularen Veränderungen spezifisch für RMG ermitteln zu können, könnten RMG vor der Proteomanalyse aus der Netzhaut isoliert werden (Grosche et al. 2016). Für einen Vergleich mit der RMG-Gliose bei der DR könnten Analysen von nativen RMG aus diabetischen Schweinen in einem initialen Krankheitsstadium erfolgen, welches hinsichtlich der Erkrankungsdauer mit unserem Modell vergleichbar wäre. Die proteomischen Signaturen *in vitro* und *in vivo* könnten dann verglichen und potenzielle Gemeinsamkeiten bei der RMG-Gliose detektiert werden.

Neben dem Nachweis ausgesuchter Netzhautproteine in unserem Modell wollten wir herausfinden, inwieweit sich das gesamte Netzhautproteom durch die Kultivierung veränderte (Kapitel 4.4.6). Eine vergleichende Proteomanalyse von frischer und drei Tage lang kultivierter Schweinenetzhaut ermöglichte es uns, die Abundanz gemeinsam identifizierter Proteine bezogen auf den jeweiligen Datensatz zu vergleichen. Insgesamt wurden 2214 Proteine in beiden Datensätzen identifiziert, was für eine große Ähnlichkeit im Hinblick auf die qualitative Zusammensetzung des Netzhautproteoms zu beiden Zeitpunkten sprach. Eine ähnliche Abundanzverteilung deutete zudem auf eine große Ähnlichkeit bei der quantitativen Zusammensetzung hin (Abb. 4.28). Wichtige funktionelle und strukturelle Netzhautmarkerproteine wurden relativ zum Gesamtdatensatz mit nur sehr geringgradigen Abweichungen ihrer Abundanzwerte exprimiert. Besonders hervorzuheben war der stabile relative Gehalt an GS in der Schweinenetzhaut nach drei Tagen in Kultur. Dabei ist der proteomisch detektierte Gesamtgehalt an GS in der Netzhaut allein der Expression in RMG zuzuordnen, da es sich um ein RMG-spezifisches Protein handelt (Germer et al. 1997). Dieses proteomische Ergebnis bestätigt damit unsere vorangegangene Untersuchung zur Darstellung des erhaltenen GS-Expressionsmusters in RMG nach drei Tagen in Kultur (Abb. 4.24).

Die bemerkenswerte qualitative und quantitative Ähnlichkeit des Proteoms zwischen unserem Netzhautmodell und frischer Schweinenetzhaut spricht dafür, dass unser Modell die frische Retina nach drei Tagen in Kultur auf molekularer Ebene umfassend abzubilden vermag. Die vorliegende Untersuchung bestätigt damit auf proteomweiter Ebene die Nähe des Netzhautkulturmodells zur *in vivo* Situation. Im Gegensatz dazu haben zahlreiche Untersuchungen an isolierten Netzhautzellen aus Säugetieren im Vergleich zu den entsprechenden nativen Zellen gezeigt, dass diese einer deutlichen Veränderung des gesamten Proteoms aufgrund der Kultivierung unterworfen sind (Hauck, Suppmann, and Ueffing 2003; Alge et al. 2003; Alge et al. 2006; Szober et al. 2012).

Zusammenfassend ist uns der Aufbau eines Schweinenetzhautmodells gelungen, das mindestens neun Tage mit erhaltener Netzhautschichtung und mindestens sechs Tage mit morphologisch intakten Zapfen verwendet werden kann. Das Modell bildet die Zusammensetzung des Proteoms von frischer Schweinenetzhaut nach drei Tagen in Kultur umfassend ab. Expressionsstudien ausgesuchter RMG-Proteine über 14 Tage *in vitro* deuten auf eine erhaltene Differenzierung sowie auf eine Aktivierung von RMG hin. Die kulturinduzierte Aktivierung könnte es erlauben, RMG im Netzhautmodell in einer Stresssituation zu untersuchen, die pathologische Prozesse *in vivo* simulieren könnte und daher interessant ist.

Unser Netzhautmodell fand bereits Anwendung im Rahmen der Aufklärung von RMG-vermittelten Mechanismen infolge einer diabetischen Stoffwechselsituation. Dabei ist es uns gelungen, die in isolierten Schweine RMG durch differenzielle Proteomanalyse beobachtete SPP1-Expressionsminderung auf Gewebeebene zu verifizieren. Die bisher unbekannte SPP1-Expressionsminderung könnte einen RMG-vermittelten Pathogenesemechanismus darstellen, der bei der DR schon in einem sehr frühen Krankheitsstadium mit der Ödementwicklung und mit neurodegenerativen Prozessen in Zusammenhang steht. Dies sollte weiterführend untersucht werden, indem eine experimentell induzierte Ödematisierung und das neuronale Überleben in Schweinenetzhautexplantaten vergleichend beurteilt werden. Dazu könnten Netzhautexplantate unter diabetischen Kulturbedingungen mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Die gezielte, Antikörper-basierte Blockade von SPP1 in den Kontrollexplantaten könnte dann bestätigen, dass es sich um einen spezifisch mit SPP1 assoziierten Mechanismus handelt.

Unsere Analysen zeigten zudem, dass Schweine RMG unter diabetischen Kulturbedingungen eine Reihe von ECM-Proteinen vermindert exprimierten, die einen stabilisierenden Effekt auf die ECM-Struktur haben. Die Destabilisierung der ECM um RMG könnte ein wichtiger Mechanismus sein, der bei der DR zur Auflösung der ILM beiträgt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die diabetische Retinopathie (DR) ist eine schwere Komplikation von Diabetes mellitus, die zur vollständigen Erblindung führen kann. Schweineaugen eignen sich aufgrund der ähnlichen Anatomie und des funktionell ähnlichen Feinbaus der Netzhaut besonders für die Erforschung der DR des Menschen. Ein wesentliches Ziel dieses Projekts war die Etablierung organotypischer Netzhautkulturen aus Schweineaugen, um daran die Pathophysiologie der DR untersuchen zu können. Organotypische Netzhautkulturen erlauben Untersuchungen an der Netzhaut nahe an der *in vivo* Situation, ohne dass dafür Experimente im Tier nötig sind.

Wir entwickelten eine reproduzierbare und manipulationsarme Präparationsmethode, mit der die Region aus dem visual streak der Schweinenetzhaut explantiert werden kann, die in ihrer zellulären Zusammensetzung der Makula des Menschen entspricht. Um kulturinduzierte Veränderungen der Neuroretina einschätzen und von behandlungsinduzierten Effekten abgrenzen zu können, haben wir eine Charakterisierung unseres Netzhautmodells durchgeführt. Diese erfolgte anhand von bildgebenden Verfahren, wobei zu diesem Zweck ein geeignetes Protokoll entwickelt wurde. Es zeigte sich der Erhalt der neuroretinalen Schichtung über mindestens neun Tage in Kultur. Müller Gliazellen (RMG) zeigten eine anhaltende Expression des RMG-spezifischen Enzyms Glutamin Synthetase, die für einen anhaltend differenzierten Zustand dieses Zelltyps im Netzhautmodell sprach. Zudem deutete die zunehmende Expression von Glial Fibrillary Acid Protein auf eine Aktivierung der RMG hin. Diese kulturinduzierte Aktivierung könnte es erlauben, RMG im Netzhautmodell in einer Stresssituation zu studieren, die für pathologische Prozesse *in vivo* repräsentativ sein könnte und daher interessant ist.

In einer vorangegangenen Studie konnte unsere Gruppe zeigen, dass in einem diabetischen Schweinemodell ein wesentliches pathologisches Merkmal der Netzhaut, die Auflösung der inneren Grenzmembran (ILM), mit funktionellen Veränderungen von RMG einhergeht. Darauf basierend war eine weitere Aufgabenstellung des Projekts, die Rolle von RMG in der diabetischen Schweinenetzhaut weiterführend zu untersuchen. Zu diesem Zweck haben wir proteomweite Veränderungen in isolierten Schweine RMG unter einer diabetischen Stoffwechselsituation untersucht.

Die vorgenommene differenzielle Proteomanalyse deutete auf eine Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (ECM) um RMG hin. Dies kam durch eine Expressionsminderung von Kollagen- α -Ketten, Fibronektin und ECM-regulierenden Enzymen (Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase 1 bis 3) zum Ausdruck. Diese Proteine nehmen eine stabilisierende Rolle bei der ECM-Struktur ein. Demnach könnte die von uns detektierte Expressionsminderung *in vivo* zu einer Destabilisierung der ECM führen und so zur Auflösung der ILM beitragen.

Darüber hinaus zeigte sich in unserem Experiment eine Expressionsminderung von Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1). Ergänzend zu den proteomischen Analysen auf Einzelzellebene verwendeten wir unser Schweinenetzhautmodell, um die beobachtete SPP1-Expressionsminderung zu verifizieren. Anhand immunhistologischer Färbungen konnten wir die SPP1-Expressionsminderung in RMG auf Ebene der intakten Netzhaut bestätigen. SPP1 ist ein ECM-Protein, das der Literatur zufolge sowohl an der Flüssigkeitshomöostase in RMG als auch an den RMG-vermittelten neuroprotektiven Prozessen in der Netzhaut beteiligt ist. Die beobachtete Expressionsminderung in RMG könnte deshalb mit der Ödementwicklung und mit neurodegenerativen Prozessen in der diabetischen Schweinenetzhaut in Verbindung stehen.

Im Rahmen dieses Projekts ist es gelungen, ein Schweinenetzhautmodell für Untersuchungen zur Pathogenese der DR zu entwickeln. Damit ergibt sich die Möglichkeit, Fragestellungen über die Rolle von RMG bei der DR nahe an der *in vivo* Situation zu klären. Ein interessanter Kandidat für weiterführende Untersuchungen wäre SPP1, das bei der DR auf Molekularebene an wichtigen RMG-vermittelten Pathogenesemechanismen beteiligt sein könnte.

7 SUMMARY

Diabetic retinopathy (DR) is a severe complication of diabetes mellitus that can lead to loss of vision. Because of the high similarity between porcine and human retina with respect to anatomy and cellular composition of the retina, porcine eyes are particularly suitable for research of DR. A major goal of this project was to establish porcine retinal organotypic cultures in order to investigate the pathophysiology of DR. Retinal organotypic cultures allow investigations of the retina close to the *in vivo* situation thus avoiding animal experiments.

We developed a reproducible preparation method for explanting the region from the visual streak of the porcine retina which resembles the cellular composition of the human macula.

In order to assess retinal adaption to culture conditions and to distinguish adaptive changes from treatment-induced effects, we performed a characterization of the retinal culture model by using optimized imaging techniques. Neuroretinal layering remained well preserved over a period of at least nine days in culture. Müller glial cells (RMG) continuously expressed the RMG-specific enzyme glutamine synthetase indicating a persistent differentiated state. Furthermore, the expression of glial fibrillary acid protein increased over time *in vitro* indicating an activation of RMG. Activation of RMG is a common occurrence upon pathological processes *in vivo* and therefore a condition of particular interest. Collectively, our porcine retinal culture model is potentially suitable for investigations on involvement of RMG in pathological processes.

In a diabetic pig model our group previously discovered functional changes of RMG being associated with disruption of the inner limiting membrane (ILM), which is an essential characteristic of retinal pathology. Based on these findings, another aim of this project was to investigate the role of RMG in the diabetic pig retina. To this end, changes in isolated porcine RMG under diabetic culture conditions were investigated on the proteome-wide level.

Differential quantitative proteome analysis revealed RMG-mediated remodeling of the extracellular matrix (ECM) under diabetic conditions. Several proteins involved in the stabilization of the ECM-structure showed decreased expression levels, such as several collagen- α -chains, fibronectin and ECM-regulating enzymes (procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 to 3). A decreased expression level of ECM

structural proteins might point to a destabilization of the ECM *in vivo* and thus might contribute to the disruption of the ILM.

We also detected a decreased protein expression level of secreted phosphoprotein 1 (SPP1) upon diabetic conditions. By immunohistochemistry we confirmed decreased protein expression of SPP1 in porcine retinal cultures under diabetic conditions. SPP1 is involved in regulation of fluid homeostasis by RMG and RMG-mediated neuroprotective processes in the retina. Therefore, the observed decrease in protein levels in RMG might contribute to edema development and neurodegenerative processes in the diabetic pig retina.

We have successfully developed a porcine retinal culture model for studying the pathogenesis of DR and in particular the role of RMG close to the *in vivo* situation. We suggest SPP1 as an interesting candidate for further investigations being potentially involved in relevant pathomechanisms mediated by RMG in DR at a molecular level.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abukawa, Hayato, Masatoshi Tomi, Jumpei Kiyokawa, Satoko Hori, Tetsu Kondo, Tetsuya Terasaki, and Ken-ichi Hosoya. 2009. "Modulation of Retinal Capillary Endothelial Cells by Müller Glial Cell-Derived Factors." *Molecular Vision* 15 (February): 451–457.
- Acharya, Nimish K., Xin Qi, Eric L. Goldwaser, George A. Godsey, Hao Wu, Mary C. Kosciuk, Theresa A. Freeman, et al. 2017. "Retinal Pathology Is Associated with Increased Blood-Retina Barrier Permeability in a Diabetic and Hypercholesterolaemic Pig Model: Beneficial Effects of the LpPLA2 Inhibitor Darapladib." *Diabetes & Vascular Disease Research* 14 (3): 200–213. doi:10.1177/1479164116683149.
- Aebbersold, Ruedi, and Matthias Mann. 2003. "Mass Spectrometry-Based Proteomics." *Nature* 422 (6928): 198–207. doi:10.1038/nature01511.
- Akanuma, Shin-ichi, Shiro Hirose, Masanori Tachikawa, and Ken-ichi Hosoya. 2013. "Localization of Organic Anion Transporting Polypeptide (Oatp) 1a4 and Oatp1c1 at the Rat Blood-Retinal Barrier." *Fluids and Barriers of the CNS* 10 (1): 29. doi:10.1186/2045-8118-10-29.
- Åkerström, Bo, Martin Cederlund, Jesper Bergwik, Oscar Manouchehrian, Karin Arnér, Ingrid Holmgren Taylor, Fredrik Ghosh, and Linnéa Taylor. 2017. "The Role of Mitochondria, Oxidative Stress, and the Radical-Binding Protein A1M in Cultured Porcine Retina." *Current Eye Research* 42 (6): 948–961. doi:10.1080/02713683.2016.1254247.
- Alarautalahti, Virpi, Symantas Ragauskas, Jenni J. Hakkarainen, Hannele Uusitalo-Järvinen, Hannu Uusitalo, Jari Hyttinen, Giedrius Kalesnykas, and Soile Nymark. 2019. "Viability of Mouse Retinal Explant Cultures Assessed by Preservation of Functionality and Morphology." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60 (6): 1914–1927. doi:10.1167/iovs.18-25156.
- Al-Awar, Amin, Krisztina Kupai, Médea Veszélka, Gergő Szűcs, Zouhair Attieh, Zsolt Murlasits, Szilvia Török, Anikó Pósa, and Csaba Varga. 2016. "Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models." *Journal of Diabetes Research* 2016: 9051426. doi:10.1155/2016/9051426.
- Alge, Claudia S., Stefanie M. Hauck, Siegfried G. Priglinger, Anselm Kampik, and Marius Ueffing. 2006. "Differential Protein Profiling of Primary versus Immortalized Human RPE Cells Identifies Expression Patterns Associated with Cytoskeletal Remodeling and Cell Survival." *Journal of Proteome Research* 5 (4): 862–878. doi:10.1021/pr050420t.
- Alge, Claudia S., Sabine Suppmann, Siegfried G. Priglinger, Aljoscha S. Neubauer, Christian A. May, Stefanie Hauck, Ulrich Welge-Lussen, Marius Ueffing, and Anselm Kampik. 2003. "Comparative Proteome Analysis of Native Differentiated and Cultured Dedifferentiated Human RPE Cells." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (8): 3629–3641. doi:10.1167/iovs.02-1225.

- Alonso-Gutierrez, Jorge, Eun-Mi Kim, Tanveer S. Batth, Nathan Cho, Qijun Hu, Leanne Jade G. Chan, Christopher J. Petzold, et al. 2015. "Principal Component Analysis of Proteomics (PCAP) as a Tool to Direct Metabolic Engineering." *Metabolic Engineering* 28 (March): 123–133. doi:10.1016/j.ymben.2014.11.011.
- Al-Ubaidi, Muayyad R., Muna I. Naash, and Shannon M. Conley. 2013. "A Perspective on the Role of the Extracellular Matrix in Progressive Retinal Degenerative Disorders." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (13): 8119–8124. doi:10.1167/iovs.13-13536.
- Amann, B., S. Hirmer, S. M. Hauck, E. Kremmer, M. Ueffing, and C. A. Deeg. 2014. "True Blue: S-Op sin Is Widely Expressed in Different Animal Species." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98 (1): 32–42. doi:10.1111/jpn.12016.
- Amann, B., Kristina J. H. Kleinwort, Sieglinde Hirmer, Walter Sekundo, Elisabeth Kremmer, Stefanie M. Hauck, and Cornelia A. Deeg. 2016. "Expression and Distribution Pattern of Aquaporin 4, 5 and 11 in Retinas of 15 Different Species." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (7). doi:10.3390/ijms17071145.
- Annan, Jaafar El, and Petros E. Carvounis. 2014. "Current Management of Vitreous Hemorrhage Due to Proliferative Diabetic Retinopathy." *International Ophthalmology Clinics* 54 (2): 141–153. doi:10.1097/IIO.000000000000027.
- Apweiler, Rolf, Charalampos Aslanidis, Thomas Deufel, Andreas Gerstner, Jens Hansen, Dennis Hochstrasser, Roland Kellner, et al. 2009. "Approaching Clinical Proteomics: Current State and Future Fields of Application in Cellular Proteomics." *Cytometry Part A* 75A (10): 816–832. doi:10.1002/cyto.a.20779.
- Arora, Meenakshi. 2013. "Cell Culture Media: A Review." *Materials and Methods* 3 (March). doi:10.13070/mm.en.3.175.
- Baksheeva, Viktoriia E., Veronika V. Tiulina, Natalia K. Tikhomirova, Olga S. Gancharova, Sergey V. Komarov, Pavel P. Philippov, Andrey A. Zamyatnin, Ivan I. Senin, and Evgeni Yu. Zernii. 2018. "Suppression of Light-Induced Oxidative Stress in the Retina by Mitochondria-Targeted Antioxidant." *Antioxidants* 8 (1). doi:10.3390/antiox8010003.
- Bapputty, Reena, Ramaprasad Talahalli, Simona Zarini, Ivy Samuels, Robert Murphy, and Rose Gubitosi-Klug. 2019. "Montelukast Prevents Early Diabetic Retinopathy in Mice." *Diabetes*, July. doi:10.2337/db19-0026.
- Barber, A. J., D. A. Antonetti, and T. W. Gardner. 2000. "Altered Expression of Retinal Occludin and Glial Fibrillary Acidic Protein in Experimental Diabetes. The Penn State Retina Research Group." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (11): 3561–3568.
- Barber, Alistair J. 2015. "Diabetic Retinopathy: Recent Advances towards Understanding Neurodegeneration and Vision Loss." *Science China Life Sciences* 58 (6): 541–549. doi:10.1007/s11427-015-4856-x.

- Barber, Alistair J., David A. Antonetti, Timothy S. Kern, Chad E. N. Reiter, Rohit S. Soans, J. Kyle Krady, Steven W. Levison, Thomas W. Gardner, and Sarah K. Bronson. 2005. "The Ins2Akita Mouse as a Model of Early Retinal Complications in Diabetes." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (6): 2210–2218. doi:10.1167/iov.04-1340.
- Bennike, Tue, Ugur Ayturk, Carla M. Haslauer, John W. Froehlich, Benedikt L. Proffen, Omar Barnaby, Svend Birkelund, et al. 2014. "A Normative Study of the Synovial Fluid Proteome from Healthy Porcine Knee Joints." *Journal of Proteome Research* 13 (10): 4377–4387. doi:10.1021/pr500587x.
- Berk, MSc Biol Benjamin-Andreas. 2015. "Brain-derived neurotrophic factor-induzierte neuroprotektive Osmoregulation der Müller-Gliazelle der Rattenretina," June. [http://ul.qucosa.de/landing-page/?tx_dlf\[id\]=http%3A%2F%2Ful.qucosa.de%2Fapi%2Fqucosa%253A13335%2Fmets](http://ul.qucosa.de/landing-page/?tx_dlf[id]=http%3A%2F%2Ful.qucosa.de%2Fapi%2Fqucosa%253A13335%2Fmets).
- Bermingham-McDonogh, O., K. L. McCabe, and T. A. Reh. 1996. "Effects of GGF/Neuregulins on Neuronal Survival and Neurite Outgrowth Correlate with ErbB2/Neu Expression in Developing Rat Retina." *Development (Cambridge, England)* 122 (5): 1427–1438.
- Bianchi, E., G. Ripandelli, J. Feher, A. M. Plateroti, R. Plateroti, I. Kovacs, P. Plateroti, S. Taurone, and M. Artico. 2015. "Occlusion of Retinal Capillaries Caused by Glial Cell Proliferation in Chronic Ocular Inflammation." *Folia Morphologica* 74 (1): 33–41. doi:10.5603/FM.2015.0006.
- Blank, H., B. Müller, and H. Korf. 1997. "Comparative Investigations of the Neuronal Apparatus in the Pineal Organ and Retina of the Rainbow Trout: Immunocytochemical Demonstration of Neurofilament 200-KDa and Neuropeptide Y, and Tracing with Dil." *Cell and Tissue Research* 288 (3): 417–425. doi:10.1007/s004410050828.
- Bradford, M. M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (May): 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999.
- Bringmann, Andreas, Thomas Pannicke, Jens Grosche, Mike Francke, Peter Wiedemann, Serguei N. Skatchkov, Neville N. Osborne, and Andreas Reichenbach. 2006. "Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 25 (4): 397–424. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.
- Bringmann, Andreas, Andreas Reichenbach, and Peter Wiedemann. 2004. "Pathomechanisms of Cystoid Macular Edema." *Ophthalmic Research* 36 (5): 241–249. doi:10.1159/000081203.
- Bringmann, Andreas, and Peter Wiedemann. 2012. "Müller Glial Cells in Retinal Disease." *Ophthalmologica* 227 (1): 1–19. doi:10.1159/000328979.
- Brownlee, Michael. 2005. "The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism." *Diabetes* 54 (6): 1615–1625. doi:10.2337/diabetes.54.6.1615.

- Bruderer, Roland, Oliver M. Bernhardt, Tejas Gandhi, Saša M. Miladinović, Lin-Yang Cheng, Simon Messner, Tobias Ehrenberger, et al. 2015. "Extending the Limits of Quantitative Proteome Profiling with Data-Independent Acquisition and Application to Acetaminophen-Treated Three-Dimensional Liver Microtissues." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 14 (5): 1400–1410. doi:10.1074/mcp.M114.044305.
- Bruderer, Roland, Oliver M. Bernhardt, Tejas Gandhi, and Lukas Reiter. 2016. "High-Precision IRT Prediction in the Targeted Analysis of Data-Independent Acquisition and Its Impact on Identification and Quantitation." *Proteomics* 16 (15–16): 2246–2256. doi:10.1002/pmic.201500488.
- Brzović-Šarić, Vlatka, Irena Landeka, Borna Šarić, Monika Barberić, Lidija Andrijašević, Branimir Cerovski, Nada Oršolić, and Domagoj Đikić. 2015. "Levels of Selected Oxidative Stress Markers in the Vitreous and Serum of Diabetic Retinopathy Patients." *Molecular Vision* 21: 649–664.
- Bull, Natalie D. 2011. "Organotypic Explant Culture of Adult Rat Retina for in Vitro Investigations of Neurodegeneration, Neuroprotection and Cell Transplantation," March. doi:10.1038/protex.2011.215.
- Bull, Natalie D., Thomas V. Johnson, Guncha Welsapar, Nicholas W. DeKorver, Stanislav I. Tomarev, and Keith R. Martin. 2011. "Use of an Adult Rat Retinal Explant Model for Screening of Potential Retinal Ganglion Cell Neuroprotective Therapies." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (6): 3309–3320. doi:10.1167/iov.10-6873.
- Burden-Gulley, Susan M., Sonya E. Ensslen, and Susann M. Brady-Kalnay. 2002. "Protein Tyrosine Phosphatase- μ Differentially Regulates Neurite Outgrowth of Nasal and Temporal Neurons in the Retina." *Journal of Neuroscience* 22 (9): 3615–3627. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-09-03615.2002.
- Busik, Julia V., L. Karl Olson, Maria B. Grant, and Douglas N. Henry. 2002. "Glucose-Induced Activation of Glucose Uptake in Cells from the Inner and Outer Blood-Retinal Barrier." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (7): 2356–2363.
- Caffé, A. R., P. Ahuja, B. Holmqvist, S. Azadi, J. Forsell, I. Holmqvist, A. K. Söderpalm, and T. van Veen. 2001. "Mouse Retina Explants after Long-Term Culture in Serum Free Medium." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 22 (4): 263–273.
- Calado, Sofia M., Liliana S. Alves, Sónia Simão, and Gabriela A. Silva. 2016. "GLUT1 Activity Contributes to the Impairment of PEDF Secretion by the RPE." <http://www.molvis.org/molvis/v22/761/>.
- Camacho, Erika T., Danielle Brager, Ghizlane Elachouri, Tatyana Korneyeva, Géraldine Millet-Puel, José-Alain Sahel, and Thierry Lévillard. 2019. "A Mathematical Analysis of Aerobic Glycolysis Triggered by Glucose Uptake in Cones." *Scientific Reports* 9 (1): 1–18. doi:10.1038/s41598-019-39901-z.

- Campbell, Matthew, and Peter Humphries. 2012. "The Blood-Retina Barrier: Tight Junctions and Barrier Modulation." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 763: 70–84.
- Carter-Dawson, Louvenia, F. Fran Shen, Ronald S. Harwerth, M. L. J. Crawford, Earl L. Smith, and Amy Whitetree. 2004. "Glutathione Content Is Altered in Müller Cells of Monkey Eyes with Experimental Glaucoma." *Neuroscience Letters* 364 (1): 7–10. doi:10.1016/j.neulet.2004.03.082.
- Cecilia, Olvera-Montaña, Castellanos-González José Alberto, Navarro-Partida José, Cardona-Muñoz Ernesto Germán, López-Contreras Ana Karen, Roman-Pintos Luis Miguel, Robles-Rivera Ricardo Raúl, and Rodríguez-Carrizalez Adolfo Daniel. 2019. "Oxidative Stress as the Main Target in Diabetic Retinopathy Pathophysiology." Research article. *Journal of Diabetes Research*. doi:10.1155/2019/8562408.
- Cepeda, Diana, Tawny Neal, Rangoli Aeran, Mehdi Gasmi, and Annahita Keravala. 2016. "607. Organotypic Culture of Adult Porcine Retina as an In Vitro Screening Model for AAV-Mediated Gene Therapy in Ophthalmology." *Molecular Therapy* 24 (May): S240–S241. doi:10.1016/S1525-0016(16)33415-3.
- Chaib, E., F. H. F. Galvão, J. A. Rocha-Filho, B. L. Silveira, L. Chen, M. P. D. de C Carvalho, C. E. Pariz, et al. 2011. "Total Pancreatectomy: Porcine Model for Inducing Diabetes - Anatomical Assessment and Surgical Aspects." *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Europeennes* 46 (1): 52–55. doi:10.1159/000321876.
- Chandler, Smith, Samuelson, and Mackay. 1999. "Photoreceptor Density of the Domestic Pig Retina." *Veterinary Ophthalmology* 2 (3): 179–184. doi:10.1046/j.1463-5224.1999.00077.x.
- Chang, William, Michelle Lajko, and Amani A. Fawzi. 2018. "Endothelin-1 Is Associated with Fibrosis in Proliferative Diabetic Retinopathy Membranes." *PLOS ONE* 13 (1): e0191285. doi:10.1371/journal.pone.0191285.
- Cheng, Christiana L., Hidayat Djajadi, and Robert S. Molday. 2013. "Cell-Specific Markers for the Identification of Retinal Cells by Immunofluorescence Microscopy." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 935: 185–199. doi:10.1007/978-1-62703-080-9_12.
- Chévez, P., and Ramon L. Font. 1993. "Practical Applications of Some Antibodies Labelling the Human Retina." *Histology and Histopathology* 8 (3): 437–442.
- Christensen, Ian, Bo Lu, Ning Yang, Kevin Huang, Ping Wang, and Ning Tian. 2019. "The Susceptibility of Retinal Ganglion Cells to Glutamatergic Excitotoxicity Is Type-Specific." *Frontiers in Neuroscience* 13. doi:10.3389/fnins.2019.00219.
- Combes, Robert D., and Atul B. Shah. 2016. "The Use of in Vivo, Ex Vivo, in Vitro, Computational Models and Volunteer Studies in Vision Research and Therapy, and Their Contribution to the Three Rs." *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 44 (3): 187–238. doi:10.1177/026119291604400302.

-
- Corcóstegui, Borja, Santiago Durán, María Olga González-Albarrán, Cristina Hernández, José María Ruiz-Moreno, Javier Salvador, Patricia Udaondo, and Rafael Simó. 2017. "Update on Diagnosis and Treatment of Diabetic Retinopathy: A Consensus Guideline of the Working Group of Ocular Health (Spanish Society of Diabetes and Spanish Vitreous and Retina Society)." *Journal of Ophthalmology* 2017. doi:10.1155/2017/8234186.
- Coscas, Gabriel, José Cunha-Vaz, and Gisèle Soubrane. 2010. "Macular Edema: Definition and Basic Concepts." *Developments in Ophthalmology* 47: 1–9. doi:10.1159/000320070.
- Costello, Fiona, and Jodie M Burton. 2018. "Retinal Imaging with Optical Coherence Tomography: A Biomarker in Multiple Sclerosis?" *Eye and Brain* 10 (July): 47–63. doi:10.2147/EB.S139417.
- Coughlin, Brandon A., Derrick J. Feenstra, and Susanne Mohr. 2017. "Müller Cells and Diabetic Retinopathy." *Vision Research* 139 (October): 93–100. doi:10.1016/j.visres.2017.03.013.
- Craft, Cheryl Mae, and Janise D. Deming. 2014. "Cone Arrestin: Deciphering the Structure and Functions of Arrestin 4 in Vision." *Handbook of Experimental Pharmacology* 219: 117–131. doi:10.1007/978-3-642-41199-1_6.
- Cunha-Vaz, José. 2017. "Mechanisms of Retinal Fluid Accumulation and Blood-Retinal Barrier Breakdown." *Macular Edema* 58: 11–20. doi:10.1159/000455265.
- Daruich, Alejandra, Alexandre Matet, Alexandre Moulin, Laura Kowalczyk, Michaël Nicolas, Alexandre Sellam, Pierre-Raphaël Rothschild, et al. 2018. "Mechanisms of Macular Edema: Beyond the Surface." *Progress in Retinal and Eye Research* 63: 20–68. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.10.006.
- Davis, Martin N., Sally Horne-Badovinac, and Alexandra Naba. 2019. "In-Silico Definition of the Drosophila Melanogaster Matrisome." *BioRxiv*, August, 722868. doi:10.1101/722868.
- Dawson, Harry D., Allen D. Smith, Celine Chen, and Joseph F. Urban. 2017. "An In-Depth Comparison of the Porcine, Murine and Human Inflammasomes; Lessons from the Porcine Genome and Transcriptome." *Veterinary Microbiology* 202 (April): 2–15. doi:10.1016/j.vetmic.2016.05.013.
- de Carlo, Talisa E., Adam T. Chin, Marco A. Bonini Filho, Mehreen Adhi, Lauren Branchini, David A. Salz, Caroline R. Bauman, et al. 2015. "DETECTION OF MICROVASCULAR CHANGES IN EYES OF PATIENTS WITH DIABETES BUT NOT CLINICAL DIABETIC RETINOPATHY USING OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY ANGIOGRAPHY." *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35 (11): 2364–2370. doi:10.1097/IAE.0000000000000882.
- Deeg, Cornelia A., Christina Eberhardt, Florian Hofmaier, Barbara Amann, and Stefanie M. Hauck. 2011. "Osteopontin and Fibronectin Levels Are Decreased in Vitreous of Autoimmune Uveitis and Retinal Expression of Both Proteins

- Indicates ECM Re-Modeling." *PloS One* 6 (12): e27674. doi:10.1371/journal.pone.0027674.
- Defaix, Celine, Audrey Solgadi, Thu Ha Pham, Alain M. Gardier, Pierre Chaminade, and Laurent Tritschler. 2018. "Rapid Analysis of Glutamate, Glutamine and GABA in Mice Frontal Cortex Microdialysis Samples Using HPLC Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 152 (April): 31–38. doi:10.1016/j.jpba.2018.01.039.
- Del Río, Patricia, Martin Irmeler, Blanca Arango-González, Jack Favor, Caroline Bobe, Udo Bartsch, Elena Vecino, Johannes Beckers, Stefanie M. Hauck, and Marius Ueffing. 2011. "GDNF-induced osteopontin from Müller glial cells promotes photoreceptor survival in the Pde6brd1 mouse model of retinal degeneration." *Glia* 59 (5): 821–832. doi:10.1002/glia.21155.
- Deschler, Emily K., Jennifer K. Sun, and Paolo S. Silva. 2014. "Side-Effects and Complications of Laser Treatment in Diabetic Retinal Disease." *Seminars in Ophthalmology* 29 (5–6): 290–300. doi:10.3109/08820538.2014.959198.
- Di Lauro, Salvatore, David Rodriguez-Crespo, Manuel J. Gayoso, Maria T. Garcia-Gutierrez, J. Carlos Pastor, Girish K. Srivastava, and Ivan Fernandez-Bueno. 2016. "A Novel Coculture Model of Porcine Central Neuroretina Explants and Retinal Pigment Epithelium Cells." *Molecular Vision* 22 (March): 243–253.
- Distefano, Laura N., Jose Garcia-Arumi, Vicente Martinez-Castillo, and Anna Boixadera. 2017. "Combination of Anti-VEGF and Laser Photocoagulation for Diabetic Macular Edema: A Review." *Journal of Ophthalmology* 2017: 2407037. doi:10.1155/2017/2407037.
- Dong, Changxia, Peng Liu, Huaizhou Wang, Mei Dong, Guangxin Li, and Yuanbin Li. 2019. "Ginsenoside Rb1 Attenuates Diabetic Retinopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *Acta Cirurgica Brasileira* 34 (2): e201900201. doi:10.1590/s0102-8650201900201.
- Dong, Chaoling, E. Scott Helton, Ping Zhou, Xuan Ouyang, Xavier d'Anglemont de Tassigny, Alberto Pascual, José López-Barneo, and Eroboghene E. Ubogu. 2018. "Glial-Derived Neurotrophic Factor Is Essential for Blood-Nerve Barrier Functional Recovery in an Experimental Murine Model of Traumatic Peripheral Neuropathy." *Tissue Barriers* 6 (2): 1–22. doi:10.1080/21688370.2018.1479570.
- Duarte, Diego A., Alexandros Papadimitriou, Richard E. Gilbert, Kerri Thai, Yanling Zhang, Mariana A. B. Rosales, José B. Lopes de Faria, and Jacqueline M. Lopes de Faria. 2016. "Conditioned Medium from Early-Outgrowth Bone Marrow Cells Is Retinal Protective in Experimental Model of Diabetes." *PloS One* 11 (2): e0147978. doi:10.1371/journal.pone.0147978.
- Eberhardt, Christina, Barbara Amann, Annette Feuchtinger, Stefanie M. Hauck, and Cornelia A. Deeg. 2011. "Differential Expression of Inwardly Rectifying K⁺ Channels and Aquaporins 4 and 5 in Autoimmune Uveitis Indicates Misbalance in Müller Glial Cell-Dependent Ion and Water Homeostasis." *Glia* 59 (5): 697–707. doi:10.1002/glia.21139.

- Elmi, Alberto, Domenico Ventrella, Luca Laghi, Giacomo Carnevali, Chenglin Zhu, Grazia Pertile, Francesca Barone, Fabio Benfenati, and Maria Laura Bacci. 2019. "1H NMR Spectroscopy Characterization of Porcine Vitreous Humor in Physiological and Photoreceptor Degeneration Conditions." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60 (2): 741–747. doi:10.1167/iovs.18-25675.
- Engelsberg, Karl, and Fredrik Ghosh. 2007. "Transplantation of Cultured Adult Porcine Full-Thickness Retina." *Cell Transplantation* 16 (1): 31–39. doi:10.3727/000000007783464506.
- Fan, Yichao, Kun Liu, Qingping Wang, Yuanyuan Ruan, Yu Zhang, and Wen Ye. 2014. "Exendin-4 Protects Retinal Cells from Early Diabetes in Goto-Kakizaki Rats by Increasing the Bcl-2/Bax and Bcl-XL/Bax Ratios and Reducing Reactive Gliosis." *Molecular Vision* 20: 1557–1568.
- Fernández, Juan M., Gisela Di Giusto, Maia Kalstein, Luciana Melamud, Valeria Rivarola, Paula Ford, and Claudia Capurro. 2013. "Cell Volume Regulation in Cultured Human Retinal Müller Cells Is Associated with Changes in Transmembrane Potential." *PLOS ONE* 8 (2): e57268. doi:10.1371/journal.pone.0057268.
- Fernandez-Bueno, Iván, Laura Fernández-Sánchez, Manuel J. Gayoso, María T. García-Gutierrez, José C. Pastor, and Nicolás Cuenca. 2012. "Time Course Modifications in Organotypic Culture of Human Neuroretina." *Experimental Eye Research* 104 (November): 26–38. doi:10.1016/j.exer.2012.08.012.
- Fernandez-Bueno, Ivan, Jose Carlos Pastor, Manuel Jose Gayoso, Ignacio Alcalde, and Maria Teresa Garcia. 2008. "Müller and Macrophage-like Cell Interactions in an Organotypic Culture of Porcine Neuroretina." *Molecular Vision* 14 (November): 2148–2156.
- Ferrer-Martín, Rosa M., David Martín-Oliva, Ana Sierra, Maria-Carmen Carrasco, María Martín-Estebané, Ruth Calvente, José L. Marín-Teva, Julio Navascués, and Miguel A. Cuadros. 2014. "Microglial Cells in Organotypic Cultures of Developing and Adult Mouse Retina and Their Relationship with Cell Death." *Experimental Eye Research* 121 (April): 42–57. doi:10.1016/j.exer.2014.02.015.
- Fine, B. S., and A. J. Brucker. 1981. "Macular Edema and Cystoid Macular Edema." *American Journal of Ophthalmology* 92 (4): 466–481. doi:10.1016/0002-9394(81)90638-3.
- Fisher, Steven K., Geoffrey P. Lewis, Kenneth A. Linberg, and Mark R. Verardo. 2005. "Cellular Remodeling in Mammalian Retina: Results from Studies of Experimental Retinal Detachment." *Progress in Retinal and Eye Research* 24 (3): 395–431. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.10.004.
- Flaxman, Seth R., Rupert R. A. Bourne, Serge Resnikoff, Peter Ackland, Tasanee Braithwaite, Maria V. Cicinelli, Aditi Das, et al. 2017. "Global Causes of Blindness and Distance Vision Impairment 1990-2020: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet. Global Health* 5 (12): e1221–e1234. doi:10.1016/S2214-109X(17)30393-5.

- Flisikowska, Tatiana, Alexander Kind, and Angelika Schnieke. 2014. "Genetically Modified Pigs to Model Human Diseases." *Journal of Applied Genetics* 55 (1): 53–64. doi:10.1007/s13353-013-0182-9.
- Fontainhas, Aurora Maria, and Ellen Townes-Anderson. 2011. "RhoA Inactivation Prevents Photoreceptor Axon Retraction in an In Vitro Model of Acute Retinal Detachment." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (1): 579–587. doi:10.1167/iovs.10-5744.
- Frantz, Christian, Kathleen M. Stewart, and Valerie M. Weaver. 2010. "The Extracellular Matrix at a Glance." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 24): 4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820.
- Frydkjaer-Olsen, Ulrik, Rasmus Soegaard Hansen, Knud Pedersen, Tunde Peto, and Jakob Grauslund. 2015. "Retinal Vascular Fractals Correlate With Early Neurodegeneration in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56 (12): 7438–7443. doi:10.1167/iovs.15-17449.
- Fu, Shuhua, Shuqian Dong, Meili Zhu, David M. Sherry, Changyun Wang, Zhipeng You, Jody J. Haigh, and Yun-Zheng Le. 2015. "Müller Glia Are a Major Cellular Source of Survival Signals for Retinal Neurons in Diabetes." *Diabetes* 64 (10): 3554–3563. doi:10.2337/db15-0180.
- Galochkina, Tatiana, Matthieu Ng Fuk Chong, Lylia Challali, Sonia Abbar, and Catherine Etchebest. 2019. "New Insights into GluT1 Mechanics during Glucose Transfer." *Scientific Reports* 9 (1): 1–14. doi:10.1038/s41598-018-37367-z.
- Garcá, Mónica, Javier Ruiz-Ederra, Henesto Hernández-Barbáchano, and Elena Vecino. 2005. "Topography of Pig Retinal Ganglion Cells." *Journal of Comparative Neurology* 486 (4): 361–372. doi:10.1002/cne.20516.
- Garcia, Tarcyane Barata, Thomas Pannicke, Stefanie Vogler, Benjamin-Andreas Berk, Antje Grosche, Peter Wiedemann, Johannes Seeger, Andreas Reichenbach, Anderson Manoel Herculano, and Andreas Bringmann. 2014. "Nerve Growth Factor Inhibits Osmotic Swelling of Rat Retinal Glial (Müller) and Bipolar Cells by Inducing Glial Cytokine Release." *Journal of Neurochemistry* 131 (3): 303–313. doi:10.1111/jnc.12822.
- García-Campos, Miguel A., Jesús Espinal-Enríquez, and Enrique Hernández-Lemus. 2015. "Pathway Analysis: State of the Art." *Frontiers in Physiology* 6: 383. doi:10.3389/fphys.2015.00383.
- Garcia-Martin, Elena, Marta Cipres, Isabel Melchor, Laura Gil-Arribas, Elisa Vilades, Vicente Polo, Maria Jesus Rodrigo, and Maria Satue. 2019. "Neurodegeneration in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus without Diabetic Retinopathy." Research article. *Journal of Ophthalmology*. doi:10.1155/2019/1825819.
- George, Biju, Shali Chen, Varun Chaudhary, John Gonder, and Subrata Chakrabarti. 2009. "Extracellular Matrix Proteins in Epiretinal Membranes and in Diabetic

- Retinopathy." *Current Eye Research* 34 (2): 134–144.
doi:10.1080/02713680802585946.
- Geraldes, Pedro, Junko Hiraoka-Yamamoto, Motonobu Matsumoto, Allen Clermont, Michael Leitges, Andre Marette, Lloyd P. Aiello, Timothy S. Kern, and George L. King. 2009. "Activation of PKC-Delta and SHP-1 by Hyperglycemia Causes Vascular Cell Apoptosis and Diabetic Retinopathy." *Nature Medicine* 15 (11): 1298–1306. doi:10.1038/nm.2052.
- Germer, A., C. Jahnke, A. Mack, V. Enzmann, and A. Reichenbach. 1997. "Modification of Glutamine Synthetase Expression by Mammalian Müller (Glial) Cells in Retinal Organ Cultures." *Neuroreport* 8 (14): 3067–3072. doi:10.1097/00001756-199709290-00012.
- Ghallab, Ahmed. 2013. "In Vitro Test Systems and Their Limitations." *EXCLI Journal* 12: 1024–1026.
- Ghaseminejad, Farhad, Lew Kaplan, Anna M. Pfaller, Stefanie M. Hauck, and Antje Grosche. 2019. "The Role of Müller Cell Glucocorticoid Signaling in Diabetic Retinopathy." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, November. doi:10.1007/s00417-019-04521-w.
- Ghosh, Fredrik, Linnéa Taylor, and Karin Arnér. 2012. "Exogenous Glutamate Modulates Porcine Retinal Development in Vitro." *Developmental Neuroscience* 34 (5): 428–439. doi:10.1159/000343721.
- Giacco, Ferdinando, and Michael Brownlee. 2010. "Oxidative Stress and Diabetic Complications." *Circulation Research* 107 (9): 1058–1070. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
- Goh, James Kang Hao, Carol Y. Cheung, Shaun Sebastian Sim, Pok Chien Tan, Gavin Siew Wei Tan, and Tien Yin Wong. 2016. "Retinal Imaging Techniques for Diabetic Retinopathy Screening." *Journal of Diabetes Science and Technology* 10 (2): 282–294. doi:10.1177/1932296816629491.
- Graca, Anna B., Claire Hippert, and Rachael A. Pearson. 2018. "Müller Glia Reactivity and Development of Gliosis in Response to Pathological Conditions." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1074: 303–308. doi:10.1007/978-3-319-75402-4_37.
- Graves, Paul R., and Timothy A. J. Haystead. 2002. "Molecular Biologist's Guide to Proteomics." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 66 (1): 39–63; table of contents. doi:10.1128/mubr.66.1.39-63.2002.
- Grenell, Allison, Yekai Wang, Michelle Yam, Aditi Swarup, Tanya L. Dilan, Allison Hauer, Jonathan D. Linton, et al. 2019. "Loss of MPC1 Reprograms Retinal Metabolism to Impair Visual Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (9): 3530–3535. doi:10.1073/pnas.1812941116.
- Grosche, Antje, Alexandra Hauser, Marlen Franziska Lepper, Rebecca Mayo, Christine von Toerne, Juliane Merl-Pham, and Stefanie M. Hauck. 2016. "The

- Proteome of Native Adult Müller Glial Cells From Murine Retina." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 15 (2): 462–480. doi:10.1074/mcp.M115.052183.
- Grosche, Antje, Thomas Pannicke, Ju Chen, Peter Wiedemann, Andreas Reichenbach, and Andreas Bringmann. 2013. "Disruption of Endogenous Purinergic Signaling Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor- and Glutamate-Induced Osmotic Volume Regulation of Müller Glial Cells in Knockout Mice." *Ophthalmic Research* 50 (4): 209–214. doi:10.1159/000354082.
- Gu, Limin, Hua Xu, Fang Wang, Guoxu Xu, Debasish Sinha, Juan Wang, Jing-Ying Xu, et al. 2014. "Erythropoietin Exerts a Neuroprotective Function Against Glutamate Neurotoxicity in Experimental Diabetic Retina." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55 (12): 8208–8222. doi:10.1167/iovs.14-14435.
- Gu, Limin, Hua Xu, Chaoyang Zhang, Qian Yang, Limei Zhang, and Jingfa Zhang. 2019. "Time-Dependent Changes in Hypoxia- and Gliosis-Related Factors in Experimental Diabetic Retinopathy." *Eye* 33 (4): 600–609. doi:10.1038/s41433-018-0268-z.
- Güemes, Maria, Sofia A. Rahman, and Khalid Hussain. 2016. "What Is a Normal Blood Glucose?" *Archives of Disease in Childhood* 101 (6): 569–574. doi:10.1136/archdischild-2015-308336.
- Gundogan, Fatih C., Umit Yolcu, Fahrettin Akay, Abdullah Ilhan, Gokhan Ozge, and Salih Uzun. 2016. "Diabetic Macular Edema." *Pakistan Journal of Medical Sciences* 32 (2): 505–510. doi:10.12669/pjms.322.8496.
- Gurel, Zafer, Balyn W. Zaro, Matthew R. Pratt, and Nader Sheibani. 2014. "Identification of O-GlcNAc Modification Targets in Mouse Retinal Pericytes: Implication of P53 in Pathogenesis of Diabetic Retinopathy." *PloS One* 9 (5): e95561. doi:10.1371/journal.pone.0095561.
- Gustmann, Sebastian, and Nicole Dünker. 2010. "In Vivo-like Organotypic Murine Retinal Wholemount Culture." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 35 (January). doi:10.3791/1634.
- Halfter, W., S. Dong, A. Dong, A. W. Eller, and R. Nischt. 2008. *Origin and Turnover of ECM Proteins from the Inner Limiting Membrane and Vitreous Body*. Report. Nature Publishing Group. doi:10.1038/eye.2008.19.
- Hauck, Stefanie M., Johannes Dietter, Roxane L. Kramer, Florian Hofmaier, Johanna K. Zipplies, Barbara Amann, Annette Feuchtinger, Cornelia A. Deeg, and Marius Ueffing. 2010. "Deciphering Membrane-Associated Molecular Processes in Target Tissue of Autoimmune Uveitis by Label-Free Quantitative Mass Spectrometry." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 9 (10): 2292–2305. doi:10.1074/mcp.M110.001073.
- Hauck, Stefanie M., Florian Hofmaier, Johannes Dietter, Margarete E. Swadzba, Marcel Blindert, Barbara Amann, Jennifer Behler, Elisabeth Kremmer, Marius Ueffing, and Cornelia A. Deeg. 2012. "Label-Free LC-MSMS Analysis of

- Vitreous from Autoimmune Uveitis Reveals a Significant Decrease in Secreted Wnt Signalling Inhibitors DKK3 and SFRP2." *Journal of Proteomics* 75 (14): 4545–4554. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.052.
- Hauck, Stefanie M., Stephanie Schoeffmann, Barbara Amann, Manfred Stangassinger, Hartmut Gerhards, Marius Ueffing, and Cornelia A. Deeg. 2007. "Retinal Mueller Glial Cells Trigger the Hallmark Inflammatory Process in Autoimmune Uveitis." *Journal of Proteome Research* 6 (6): 2121–2131. doi:10.1021/pr060668y.
- Hauck, Stefanie M., Sabine Suppmann, and Marius Ueffing. 2003. "Proteomic Profiling of Primary Retinal Müller Glia Cells Reveals a Shift in Expression Patterns upon Adaptation to in Vitro Conditions." *Glia* 44 (3): 251–263. doi:10.1002/glia.10292.
- Haverkamp, Silke, and Heinz Wässle. 2000. "Immunocytochemical Analysis of the Mouse Retina." *Journal of Comparative Neurology* 424 (1): 1–23. doi:10.1002/1096-9861(20000814)424:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-V.
- Heidinger, V., D. Hicks, J. Sahel, and H. Dreyfus. 1999. "Ability of Retinal Müller Glial Cells to Protect Neurons against Excitotoxicity in Vitro Depends upon Maturation and Neuron-Glial Interactions." *Glia* 25 (3): 229–239.
- Hendrickson, Anita, and David Hicks. 2002. "Distribution and Density of Medium- and Short-Wavelength Selective Cones in the Domestic Pig Retina." *Experimental Eye Research* 74 (4): 435–444. doi:10.1006/exer.2002.1181.
- Heng, L. Z., O. Comyn, T. Peto, C. Tadros, E. Ng, S. Sivaprasad, and P. G. Hykin. 2013. "Diabetic Retinopathy: Pathogenesis, Clinical Grading, Management and Future Developments." *Diabetic Medicine* 30 (6): 640–650. doi:10.1111/dme.12089.
- Hirrlinger, Petra G., Antje Wurm, Johannes Hirrlinger, Andreas Bringmann, and Andreas Reichenbach. 2008. "Osmotic Swelling Characteristics of Glial Cells in the Murine Hippocampus, Cerebellum, and Retina in Situ." *Journal of Neurochemistry* 105 (4): 1405–1417. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05243.x.
- Hollborn, Margrit, Sladjana Dukic-Stefanovic, Thomas Pannicke, Elke Ulbricht, Andreas Reichenbach, Peter Wiedemann, Andreas Bringmann, and Leon Kohen. 2011. "Expression of Aquaporins in the Retina of Diabetic Rats." *Current Eye Research* 36 (9): 850–856. doi:10.3109/02713683.2011.593108.
- Homma, Keiko, Yoshiki Koriyama, Kazuhiro Mawatari, Yoshihiro Higuchi, Jun Kosaka, and Satoru Kato. 2007. "Early Downregulation of IGF-I Decides the Fate of Rat Retinal Ganglion Cells after Optic Nerve Injury." *Neurochemistry International* 50 (5): 741–748. doi:10.1016/j.neuint.2007.01.011.
- Honegger, A., and R. E. Humbel. 1986. "Insulin-like Growth Factors I and II in Fetal and Adult Bovine Serum. Purification, Primary Structures, and Immunological Cross-Reactivities." *The Journal of Biological Chemistry* 261 (2): 569–575.

- Horwitz, Anna, Beáta Éva Petrovski, Christian Torp-Pedersen, and Miriam Kolko. 2016. "Danish Nationwide Data Reveal a Link between Diabetes Mellitus, Diabetic Retinopathy, and Glaucoma." Research article. *Journal of Diabetes Research*. doi:10.1155/2016/2684674.
- Huber, Gesine, Severin Heynen, Coni Imsand, Franziska vom Hagen, Regine Muehlfriedel, Naoyuki Tanimoto, Yuxi Feng, et al. 2010. "Novel Rodent Models for Macular Research." *PLoS ONE* 5 (10). doi:10.1371/journal.pone.0013403.
- Hulsen, Tim, Jacob de Vlieg, and Wynand Alkema. 2008. "BioVenn – a Web Application for the Comparison and Visualization of Biological Lists Using Area-Proportional Venn Diagrams." *BMC Genomics* 9 (1): 488. doi:10.1186/1471-2164-9-488.
- Hurst, José, Sandra Kuehn, Adelina Jashari, Teresa Tsai, Karl Ulrich Bartz-Schmidt, Sven Schnichels, and Stephanie C. Joachim. 2017. "A Novel Porcine *Ex Vivo* Retina Culture Model for Oxidative Stress Induced by H₂O₂." *Alternatives to Laboratory Animals* 45 (1): 11–25. doi:10.1177/026119291704500105.
- Huster, D., O. P. Hjelle, F. M. Haug, E. A. Nagelhus, W. Reichelt, and O. P. Ottersen. 1998. "Subcellular Compartmentation of Glutathione and Glutathione Precursors. A High Resolution Immunogold Analysis of the Outer Retina of Guinea Pig." *Anatomy and Embryology* 198 (4): 277–287. doi:10.1007/s004290050184.
- "IDF Diabetes Atlas 9th Edition 2019." 2019. Accessed November 13. <https://www.diabetesatlas.org/en/>.
- Igarashi, Y., H. Chiba, H. Utsumi, H. Miyajima, T. Ishizaki, T. Gotoh, K. Kuwahara, et al. 2000. "Expression of Receptors for Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and Neurturin in the Inner Blood-Retinal Barrier of Rats." *Cell Structure and Function* 25 (4): 237–241. doi:10.1247/csf.25.237.
- Jhala, Dhvani, Hilal Rather, Dhaval Kedaria, Juhi Shah, Sanjay Singh, and Rajesh Vasita. 2019. "Biomimetic Polycaprolactone-Chitosan Nanofibrous Substrate Influenced Cell Cycle and ECM Secretion Affect Cellular Uptake of Nanoclusters." *Bioactive Materials* 4 (1): 79–86. doi:10.1016/j.bioactmat.2018.12.004.
- Johansson, Ulrica Englund, Sajedeh Eftekhari, and Karin Warfvinge. 2010. "A Battery of Cell- and Structure-Specific Markers for the Adult Porcine Retina." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 58 (4): 377–389. doi:10.1369/jhc.2009.954933.
- Johnson, Thomas V., and Keith R. Martin. 2008. "Development and Characterization of an Adult Retinal Explant Organotypic Tissue Culture System as an *in Vitro* Intraocular Stem Cell Transplantation Model." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (8): 3503–3512. doi:10.1167/iovs.07-1601.
- Joselevitch, Christina. 2008. "Human Retinal Circuitry and Physiology." *Psychology & Neuroscience* 1 (2): 141–165. doi:10.1590/S1983-32882008000200008.

- Kadłubowska, Joanna, Lucia Malaguarnera, Piotr Wąż, and Katarzyna Zorena. 2016. "Neurodegeneration and Neuroinflammation in Diabetic Retinopathy: Potential Approaches to Delay Neuronal Loss." *Current Neuropharmacology* 14 (8): 831–839.
- Kaempf, Stefanie, Peter Walter, Anna Katharina Salz, and Gabriele Thumann. 2008. "Novel Organotypic Culture Model of Adult Mammalian Neurosensory Retina in Co-Culture with Retinal Pigment Epithelium." *Journal of Neuroscience Methods* 173 (1): 47–58. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.05.018.
- Kanwar, Mamta, and Renu A. Kowluru. 2009. "Role of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase in the Development and Progression of Diabetic Retinopathy." *Diabetes* 58 (1): 227–234. doi:10.2337/db08-1025.
- Kechad, Amel, Christine Jolicoeur, Adele Tufford, Pierre Mattar, Renee W. Y. Chow, William A. Harris, and Michel Cayouette. 2012. "Numb Is Required for the Production of Terminal Asymmetric Cell Divisions in the Developing Mouse Retina." *Journal of Neuroscience* 32 (48): 17197–17210. doi:10.1523/JNEUROSCI.4127-12.2012.
- Kelly, Kristen, Joshua J. Wang, and Sarah X. Zhang. 2018. "The Unfolded Protein Response Signaling and Retinal Müller Cell Metabolism." *Neural Regeneration Research* 13 (11): 1861–1870. doi:10.4103/1673-5374.239431.
- Kern, Timothy S., David A. Antonetti, and Lois E. H. Smith. 2019. "Pathophysiology of Diabetic Retinopathy: Contribution and Limitations of Laboratory Research." *Ophthalmic Research* 62 (4): 196–202. doi:10.1159/000500026.
- Kharroubi, Akram T., and Hisham M. Darwish. 2015. "Diabetes Mellitus: The Epidemic of the Century." *World Journal of Diabetes* 6 (6): 850–867. doi:10.4239/wjd.v6.i6.850.
- Kida, Teruyo, Hidehiro Oku, Taeko Horie, Masanori Fukumoto, Yoshitaka Okuda, Seita Morishita, and Tsunehiko Ikeda. 2017. "Implication of VEGF and Aquaporin 4 Mediating Müller Cell Swelling to Diabetic Retinal Edema." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 255 (6): 1149–1157. doi:10.1007/s00417-017-3631-z.
- Kim, Junghyun, Ki Mo Kim, Chan-Sik Kim, Eunjin Sohn, Yun Mi Lee, Kyuhyung Jo, and Jin Sook Kim. 2012. "Puerarin Inhibits the Retinal Pericyte Apoptosis Induced by Advanced Glycation End Products in Vitro and in Vivo by Inhibiting NADPH Oxidase-Related Oxidative Stress." *Free Radical Biology & Medicine* 53 (2): 357–365. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.030.
- Kleinwort, Kristina J. H., Barbara Amann, Stefanie M. Hauck, Sieglinde Hirmer, Andreas Blutke, Simone Renner, Patrizia B. Uhl, et al. 2017. "Retinopathy with Central Oedema in an INSC94Y Transgenic Pig Model of Long-Term Diabetes." *Diabetologia* 60 (8): 1541–1549. doi:10.1007/s00125-017-4290-7.
- Kobuch, Karin, Wolfgang A. Herrmann, Carsten Framme, Helmut G. Sachs, Veit-Peter Gabel, and Jost Hillenkamp. 2008. "Maintenance of Adult Porcine Retina

- and Retinal Pigment Epithelium in Perfusion Culture: Characterisation of an Organotypic in Vitro Model." *Experimental Eye Research* 86 (4): 661–668. doi:10.1016/j.exer.2008.01.011.
- Kocaoglu, Omer P., Zhuolin Liu, Furu Zhang, Kazuhiro Kurokawa, Ravi S. Jonnal, and Donald T. Miller. 2016. "Photoreceptor Disc Shedding in the Living Human Eye." *Biomedical Optics Express* 7 (11): 4554–4568. doi:10.1364/BOE.7.004554.
- Kofuji, Paulo, Bernd Biedermann, Venkatraman Siddharthan, Maik Raap, Ian Iandiev, Ivan J. Milenkovic, Achim Thomzig, Rüdiger W. Veh, Andreas Bringmann, and Alexandra Reichenbach. 2002. "Kir Potassium Channel Subunit Expression in Retinal Glial Cells: Implications for Spatial Potassium Buffering." *Glia* 39 (3): 292–303. doi:10.1002/glia.10112.
- Kohner, E. M., I. M. Stratton, S. J. Aldington, R. C. Turner, and D. R. Matthews. 1999. "Microaneurysms in the Development of Diabetic Retinopathy (UKPDS 42)." *Diabetologia* 42 (9): 1107–1112. doi:10.1007/s001250051278.
- Koopmans, Frank, Jenny T. C. Ho, August B. Smit, and Ka Wan Li. 2018. "Comparative Analyses of Data Independent Acquisition Mass Spectrometric Approaches: DIA, WiSIM-DIA, and Untargeted DIA." *Proteomics* 18 (1). doi:10.1002/pmic.201700304.
- Kowluru, R. A., R. L. Engerman, G. L. Case, and T. S. Kern. 2001. "Retinal Glutamate in Diabetes and Effect of Antioxidants." *Neurochemistry International* 38 (5): 385–390. doi:10.1016/s0197-0186(00)00112-1.
- Kowluru, Renu A., Jie Tang, and Timothy S. Kern. 2001. "Abnormalities of Retinal Metabolism in Diabetes and Experimental Galactosemia: VII. Effect of Long-Term Administration of Antioxidants on the Development of Retinopathy." *Diabetes* 50 (8): 1938–1942. doi:10.2337/diabetes.50.8.1938.
- Kuhr, Heidrun, Antje Wurm, Anett Karl, Ian Iandiev, Peter Wiedemann, Andreas Reichenbach, Andreas Bringmann, and Thomas Pannicke. 2008. "Müller Cell Gliosis in Retinal Organ Culture Mimics Gliotic Alterations after Ischemia in Vivo." *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26 (7): 745–751. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.07.003.
- Kuiper, Esther J., Frans A. Van Nieuwenhoven, Marc D. de Smet, Jan C. van Meurs, Michael W. Tanck, Noelynn Oliver, Ingeborg Klaassen, Cornelis J. F. Van Noorden, Roel Goldschmeding, and Reinier O. Schlingemann. 2008. "The Angio-Fibrotic Switch of VEGF and CTGF in Proliferative Diabetic Retinopathy." *PloS One* 3 (7): e2675. doi:10.1371/journal.pone.0002675.
- Kumagai, A. K. 1999. "Glucose Transport in Brain and Retina: Implications in the Management and Complications of Diabetes." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 15 (4): 261–273.
- Kumagai, A. K., S. A. Vinores, and W. M. Pardridge. 1996. "Pathological Upregulation of Inner Blood-Retinal Barrier Glut1 Glucose Transporter

- Expression in Diabetes Mellitus." *Brain Research* 706 (2): 313–317. doi:10.1016/0006-8993(95)01335-0.
- Le, Yun-Zheng. 2017. "VEGF Production and Signaling in Müller Glia Are Critical to Modulating Vascular Function and Neuronal Integrity in Diabetic Retinopathy and Hypoxic Retinal Vascular Diseases." *Vision Research* 139 (October): 108–114. doi:10.1016/j.visres.2017.05.005.
- Lee, Hyungwoo, Kyung Eun Kang, Hyewon Chung, and Hyung Chan Kim. 2019. "Three-Dimensional Analysis of Morphologic Changes and Visual Outcomes in Diabetic Macular Edema." *Japanese Journal of Ophthalmology* 63 (3): 234–242. doi:10.1007/s10384-019-00657-8.
- Lee, Ryan, Tien Y. Wong, and Charumathi Sabanayagam. 2015. "Epidemiology of Diabetic Retinopathy, Diabetic Macular Edema and Related Vision Loss." *Eye and Vision (London, England)* 2: 17. doi:10.1186/s40662-015-0026-2.
- Lepper, Marlen F., Uli Ohmayer, Christine von Toerne, Nicole Maison, Anette-Gabriele Ziegler, and Stefanie M. Hauck. 2018. "Proteomic Landscape of Patient-Derived CD4+ T Cells in Recent-Onset Type 1 Diabetes." *Journal of Proteome Research* 17 (1): 618–634. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00712.
- Li, Daniel Q., and Netan Choudhry. 2018. "Tractional Retinal Detachment Secondary to Diabetic Retinopathy." *JAMA Ophthalmology* 136 (10): e183507. doi:10.1001/jamaophthalmol.2018.3507.
- Li, Qing, and Donald G. Puro. 2002. "Diabetes-Induced Dysfunction of the Glutamate Transporter in Retinal Müller Cells." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (9): 3109–3116.
- Li, Yafeng, Yinxi Yu, and Brian L. VanderBeek. 2019. "Anaemia and the Risk of Progression from Non-Proliferative Diabetic Retinopathy to Vision Threatening Diabetic Retinopathy." *Eye*, October, 1–8. doi:10.1038/s41433-019-0617-6.
- Li, Ying, Yan Zhang, Shounan Qi, and Guanfang Su. 2018. "Retinal Organotypic Culture – A Candidate for Research on Retinas." *Tissue and Cell* 51 (April): 1–7. doi:10.1016/j.tice.2018.01.005.
- Lieth, E., A. J. Barber, B. Xu, C. Dice, M. J. Ratz, D. Tanase, and J. M. Strother. 1998. "Glial Reactivity and Impaired Glutamate Metabolism in Short-Term Experimental Diabetic Retinopathy. Penn State Retina Research Group." *Diabetes* 47 (5): 815–820. doi:10.2337/diabetes.47.5.815.
- Lin, Zhongjing, Ping Huang, Shouyue Huang, Lei Guo, Xing Xu, Xi Shen, Bing Xie, and Yisheng Zhong. 2018. "Effect of Adenosine and Adenosine Receptor Antagonists on Retinal Müller Cell Inwardly Rectifying Potassium Channels under Exogenous Glutamate Stimulation." Research article. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2018/2749257.
- Liu, Chang, Chao-Peng Li, Jia-Jian Wang, Kun Shan, Xin Liu, and Biao Yan. 2016. "RNCR3 Knockdown Inhibits Diabetes Mellitus-Induced Retinal Reactive

- Gliosin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479 (2): 198–203. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.032.
- Liu, Ming, Jinhong Sun, Jinqiu Cui, Wei Chen, Huan Guo, Fabrizio Barbetti, and Peter Arvan. 2015. "INS-Gene Mutations: From Genetics and Beta Cell Biology to Clinical Disease." *Molecular Aspects of Medicine* 42 (April): 3–18. doi:10.1016/j.mam.2014.12.001.
- Lu, Lili, Christopher P. Seidel, Takeshi Iwase, Rebecca K. Stevens, Yuan-Yuan Gong, Xinyi Wang, Sean F. Hackett, and Peter A. Campochiaro. 2013. "Suppression of GLUT1; a New Strategy to Prevent Diabetic Complications." *Journal of Cellular Physiology* 228 (2): 251–257. doi:10.1002/jcp.24133.
- Lu, Yun-Bi, Kristian Franze, Gerald Seifert, Christian Steinhäuser, Frank Kirchhoff, Hartwig Wolburg, Jochen Guck, et al. 2006. "Viscoelastic Properties of Individual Glial Cells and Neurons in the CNS." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (47): 17759–17764. doi:10.1073/pnas.0606150103.
- Luhmann, Ulrich F. O., Clemens A. Lange, Scott Robbie, Peter M. G. Munro, Jill A. Cowing, Hannah E. J. Armer, Vy Luong, et al. 2012. "Differential Modulation of Retinal Degeneration by Ccl2 and Cx3cr1 Chemokine Signalling." *PloS One* 7 (4): e35551. doi:10.1371/journal.pone.0035551.
- Lundkvist, Andrea, Andreas Reichenbach, Christer Betsholtz, Peter Carmeliet, Hartwig Wolburg, and Milos Pekny. 2004. "Under Stress, the Absence of Intermediate Filaments from Müller Cells in the Retina Has Structural and Functional Consequences." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 16): 3481–3488. doi:10.1242/jcs.01221.
- Lung, J. C. Y., P. G. Swann, D. S. H. Wong, and H. H. L. Chan. 2012. "Global Flash Multifocal Electroretinogram: Early Detection of Local Functional Changes and Its Correlations with Optical Coherence Tomography and Visual Field Tests in Diabetic Eyes." *Documenta Ophthalmologica* 125 (2): 123–135. doi:10.1007/s10633-012-9343-0.
- Luo, Wentao, Liumei Hu, Weiye Li, Guotong Xu, Linxinyu Xu, Conghui Zhang, and Fang Wang. 2016. "Epo Inhibits the Fibrosis and Migration of Müller Glial Cells Induced by TGF- β and High Glucose." *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 254 (5): 881–890. doi:10.1007/s00417-016-3290-5.
- Magliha, Sultan F., Wedad Bardisi, Maha Al Attah, and Manal M. Khorsheed. 2018. "The Prevalence and Risk Factors of Diabetic Retinopathy in Selected Primary Care Centers during the 3-Year Screening Intervals." *Journal of Family Medicine and Primary Care* 7 (5): 975–981. doi:10.4103/jfmpc.jfmpc_85_18.
- Maliha, Ana M., Sandra Kuehn, José Hurst, Fenja Herms, Michael Fehr, Karl U. Bartz-Schmidt, H. Burkhard Dick, Stephanie C. Joachim, and Sven Schnichels. 2019. "Diminished Apoptosis in Hypoxic Porcine Retina Explant Cultures through Hypothermia." *Scientific Reports* 9 (1): 1–16. doi:10.1038/s41598-019-41113-4.

-
- Mant, Colin T., Yuxin Chen, Zhe Yan, Traian V. Popa, James M. Kovacs, Janine B. Mills, Brian P. Tripet, and Robert S. Hodges. 2007. "HPLC Analysis and Purification of Peptides." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 386: 3–55. doi:10.1007/978-1-59745-430-8_1.
- Mantych, G. J., G. S. Hageman, and S. U. Devaskar. 1993. "Characterization of Glucose Transporter Isoforms in the Adult and Developing Human Eye." *Endocrinology* 133 (2): 600–607. doi:10.1210/endo.133.2.8344201.
- Marozas, Lauren M., and Patrice E. Fort. 2014. "Diabetic Retinopathy-Update on Prevention Techniques, Present Therapies, and New Leads." *US Ophthalmic Review* 7 (1): 54–58. doi:10.17925/usor.2014.07.01.54.
- Martins-de-Souza, Daniel, Vitor M. Faça, and Fábio C. Gozzo. 2017. "DIA Is Not a New Mass Spectrometry Acquisition Method." *PROTEOMICS* 17 (7): 1700017. doi:10.1002/pmic.201700017.
- Massey, Stephen C. 1990. "Chapter 11 Cell Types Using Glutamate as a Neurotransmitter in the Vertebrate Retina." *Progress in Retinal Research* 9 (January): 399–425. doi:10.1016/0278-4327(90)90013-8.
- Mathebula, Solani D. 2018. "Biochemical Changes in Diabetic Retinopathy Triggered by Hyperglycaemia: A Review." *African Vision and Eye Health* 77 (1): 7. doi:10.4102/aveh.v77i1.439.
- Mattapallil, Mary J., Eric F. Wawrousek, Chi-Chao Chan, Hui Zhao, Jayeeta Roychoudhury, Thomas A. Ferguson, and Rachel R. Caspi. 2012. "The Rd8 Mutation of the Crb1 Gene Is Present in Vendor Lines of C57BL/6N Mice and Embryonic Stem Cells, and Confounds Ocular Induced Mutant Phenotypes." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (6): 2921–2927. doi:10.1167/iovs.12-9662.
- Matteucci, Andrea, Lucia Gaddini, Marika Villa, Monica Varano, Mariacristina Parravano, Valentina Monteleone, Francesca Cavallo, et al. 2014. "Neuroprotection by Rat Müller Glia against High Glucose-Induced Neurodegeneration through a Mechanism Involving ERK1/2 Activation." *Experimental Eye Research* 125 (August): 20–29. doi:10.1016/j.exer.2014.05.011.
- Matteucci, Andrea, Monica Varano, Cinzia Mallozzi, Lucia Gaddini, Marika Villa, Sara Gabrielli, Giuseppe Formisano, Flavia Pricci, and Fiorella Malchiodi-Albedi. 2015. "Primary Retinal Cultures as a Tool for Modeling Diabetic Retinopathy: An Overview." Research article. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2015/364924.
- Mattugini, Nicola, Juliane Merl-Pham, Elisabetta Petrozziello, Lisa Schindler, Jürgen Bernhagen, Stefanie M. Hauck, and Magdalena Götz. 2018. "Influence of White Matter Injury on Gray Matter Reactive Gliosis upon Stab Wound in the Adult Murine Cerebral Cortex." *Glia* 66 (8): 1644–1662. doi:10.1002/glia.23329.

- McDowell, Rosemary E., Peter Barabas, Josy Augustine, Olivier Chevallier, Philip McCarron, Mei Chen, J. Graham McGeown, and Tim M. Curtis. 2018. "Müller Glial Dysfunction during Diabetic Retinopathy in Rats Is Reduced by the Acrolein-Scavenging Drug, 2-Hydrazino-4,6-Dimethylpyrimidine." *Diabetologia* 61 (12): 2654–2667. doi:10.1007/s00125-018-4707-y.
- McLenachan, Samuel, Xiangting Chen, Paul G. McMenamin, and Elizabeth P. Rakoczy. 2013. "Absence of Clinical Correlates of Diabetic Retinopathy in the Ins2Akita Retina." *Clinical & Experimental Ophthalmology* 41 (6): 582–592. doi:10.1111/ceo.12084.
- McLetchie, N. G. 2002. "Alloxan Diabetes: A Discovery, Albeit a Minor One." *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* 32 (2): 134–142.
- Mehrzadi, Saeed, Manijeh Motevalian, Mozhgan Rezaei Kanavi, Iman Fatemi, Habib Ghaznavi, and Mansoor Shahriari. 2018. "Protective Effect of Melatonin in the Diabetic Rat Retina." *Fundamental & Clinical Pharmacology* 32 (4): 414–421. doi:10.1111/fcp.12361.
- Menduni, Francesco, Leon N. Davies, D. Madrid-Costa, Antonio Fratini, and James S. Wolffsohn. 2018. "Characterisation of the Porcine Eyeball as an In-Vitro Model for Dry Eye." *Contact Lens and Anterior Eye* 41 (1): 13–17. doi:10.1016/j.clae.2017.09.003.
- Mesquida, Marina, Faye Drawnel, and Sascha Fauser. 2019. "The Role of Inflammation in Diabetic Eye Disease." *Seminars in Immunopathology* 41 (4): 427–445. doi:10.1007/s00281-019-00750-7.
- Metz, Christine N., LaQueta K. Hudson, and Valentin A. Pavlov. 2016. "Rodent Models of Diabetes." In *Principles of Diabetes Mellitus*, edited by Leonid Poretzky, 1–25. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-20797-1_11-1.
- Mi, Xue-Song, Ti-Fei Yuan, Yong Ding, Jing-Xiang Zhong, and Kwok-Fai So. 2014. "Choosing Preclinical Study Models of Diabetic Retinopathy: Key Problems for Consideration." *Drug Design, Development and Therapy* 8 (November): 2311–2319. doi:10.2147/DDDT.S72797.
- Michler-Stuke, Angelika, Joachim R. Wolff, and Jane E. Bottenstein. 1984. "Factors Influencing Astrocyte Growth and Development in Defined Media." *International Journal of Developmental Neuroscience* 2 (6): 575–584. doi:10.1016/0736-5748(84)90035-2.
- Middleton, Sheldon. 2010. "Porcine Ophthalmology." *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 26 (3): 557–572. doi:10.1016/j.cvfa.2010.09.002.
- Miljković, Djordje, and Ivan Spasojević. 2013. "Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities." *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (18): 2286–2334. doi:10.1089/ars.2012.5068.

- Miller, William P., Allyson L. Toro, Alistair J. Barber, and Michael D. Dennis. 2019. "REDD1 Activates a ROS-Generating Feedback Loop in the Retina of Diabetic Mice." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60 (6): 2369–2379. doi:10.1167/iovs.19-26606.
- Millman, Jeffrey R., Teresa Doggett, Christina Oberlin, Sheng Zhang, Clay F. Semenkovich, and Rithwick Rajagopal. 2019. "Measurement of Energy Metabolism in Explanted Retinal Tissue Using Extracellular Flux Analysis." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 143 (January). doi:10.3791/58626.
- Mondal, Lakshmi Kanta, Gautam Bhaduri, and Basudev Bhattacharya. 2018. "Biochemical Scenario behind Initiation of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus." *Indian Journal of Ophthalmology* 66 (4): 535. doi:10.4103/ijo.IJO_1121_17.
- Monteoliva, Lucia, and Juan Pablo Albar. 2004. "Differential Proteomics: An Overview of Gel and Non-Gel Based Approaches." *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 3 (3): 220–239. doi:10.1093/bfgp/3.3.220.
- Mori, Fumihiko, Taiichi Hikichi, Junichi Takahashi, Taiji Nagaoka, and Akitoshi Yoshida. 2002. "Dysfunction of Active Transport of Blood-Retinal Barrier in Patients with Clinically Significant Macular Edema in Type 2 Diabetes." *Diabetes Care* 25 (7): 1248–1249. doi:10.2337/diacare.25.7.1248.
- Müller, Brigitte, Franziska Wagner, Birgit Lorenz, and Knut Stieger. 2017. "Organotypic Cultures of Adult Mouse Retina: Morphologic Changes and Gene Expression." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58 (4): 1930–1940. doi:10.1167/iovs.16-20718.
- Murali, Aparna, Charmaine A. Ramlogan-Steel, Slawomir Andrzejewski, Jason C. Steel, and Christopher J. Layton. 2019. "Retinal Explant Culture: A Platform to Investigate Human Neuro-Retina." *Clinical & Experimental Ophthalmology* 47 (2): 274–285. doi:10.1111/ceo.13434.
- Naba, Alexandra, Karl R. Clauser, Huiming Ding, Charles A. Whittaker, Steven A. Carr, and Richard O. Hynes. 2016. "The Extracellular Matrix: Tools and Insights for the 'Omics' Era." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 49 (January): 10–24. doi:10.1016/j.matbio.2015.06.003.
- Nadal-Nicolás, Francisco M., Paloma Sobrado-Calvo, Manuel Jiménez-López, Manuel Vidal-Sanz, and Marta Agudo-Barriuso. 2015. "Long-Term Effect of Optic Nerve Axotomy on the Retinal Ganglion Cell Layer." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56 (10): 6095–6112. doi:10.1167/iovs.15-17195.
- Najeeb, Bilal Haj, Christian Simader, Gabor Deak, Clemens Vass, Jutta Gamper, Alessio Montuoro, Bianca S. Gerendas, and Ursula Schmidt-Erfurth. 2017. "The Distribution of Leakage on Fluorescein Angiography in Diabetic Macular Edema: A New Approach to Its Etiology." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58 (10): 3986–3990. doi:10.1167/iovs.17-21510.

- Nauroy, Pauline, Sandrine Hughes, Alexandra Naba, and Florence Ruggiero. 2018. "The In-Silico Zebrafish Matrisome: A New Tool to Study Extracellular Matrix Gene and Protein Functions." *Matrix Biology* 65 (January): 5–13. doi:10.1016/j.matbio.2017.07.001.
- Navneet, Soumya, Xuezhi Cui, Jing Zhao, Jing Wang, Navneet Ammal Kaidery, Bobby Thomas, Kathryn E. Bollinger, Yisang Yoon, and Sylvia B. Smith. 2019. "Excess Homocysteine Upregulates the NRF2-Antioxidant Pathway in Retinal Müller Glial Cells." *Experimental Eye Research* 178: 228–237. doi:10.1016/j.exer.2018.03.022.
- Navneet, Soumya, Jing Zhao, Jing Wang, Barbara Mysona, Shannon Barwick, Navneet Ammal Kaidery, Alan Saul, et al. 2019. "Hyperhomocysteinemia-Induced Death of Retinal Ganglion Cells: The Role of Müller Glial Cells and NRF2." *Redox Biology* 24 (June): 101199. doi:10.1016/j.redox.2019.101199.
- Nentwich, Martin M., and Michael W. Ulbig. 2015. "Diabetic Retinopathy - Ocular Complications of Diabetes Mellitus." *World Journal of Diabetes* 6 (3): 489–499. doi:10.4239/wjd.v6.i3.489.
- Newman, E., and A. Reichenbach. 1996. "The Müller Cell: A Functional Element of the Retina." *Trends in Neurosciences* 19 (8): 307–312.
- Newman, Eric A., Donald A. Frambach, and Louis L. Odette. 1984. "Control of Extracellular Potassium Levels by Retinal Glial Cell K⁺ Siphoning." *Science (New York, N. Y.)* 225 (4667): 1174–1175.
- Ng, Soo Khai, John P. M. Wood, Glyn Chidlow, Guoge Han, Thaksaon Kittipassorn, Daniel J. Peet, and Robert J. Casson. 2015. "Cancer-like Metabolism of the Mammalian Retina." *Clinical & Experimental Ophthalmology* 43 (4): 367–376. doi:10.1111/ceo.12462.
- Nguyen, Thanh Tan, Jie Jin Wang, A. Richey Sharrett, F. M. Amirul Islam, Ronald Klein, Barbara E. K. Klein, Mary Frances Cotch, and Tien Yin Wong. 2008. "Relationship of Retinal Vascular Caliber With Diabetes and Retinopathy: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)." *Diabetes Care* 31 (3): 544–549. doi:10.2337/dc07-1528.
- Niyadurupola, Nuwan, Peter Sidaway, Andrew Osborne, David C. Broadway, and Julie Sanderson. 2011. "The Development of Human Organotypic Retinal Cultures (HORCs) to Study Retinal Neurodegeneration." *The British Journal of Ophthalmology* 95 (5): 720–726. doi:10.1136/bjo.2010.181404.
- Nuzzi, Raffaele, and Federico Tridico. 2015. "Local and Systemic Complications after Intravitreal Administration of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents in the Treatment of Different Ocular Diseases: A Five-Year Retrospective Study." *Seminars in Ophthalmology* 30 (2): 129–135. doi:10.3109/08820538.2013.835833.
- Oblander, S. A., S. E. Ensslen-Craig, F. M. Longo, and S. M. Brady-Kalnay. 2007. "E-Cadherin Promotes Retinal Ganglion Cell Neurite Outgrowth in a Protein

- Tyrosine Phosphatase-Mu-Dependent Manner." *Molecular and Cellular Neurosciences* 34 (3): 481–492. doi:10.1016/j.mcn.2006.12.002.
- Ogilvie, J. M., J. D. Speck, J. M. Lett, and T. T. Fleming. 1999. "A Reliable Method for Organ Culture of Neonatal Mouse Retina with Long-Term Survival." *Journal of Neuroscience Methods* 87 (1): 57–65.
- Ogurtsova, K., J. D. da Rocha Fernandes, Y. Huang, U. Linnenkamp, L. Guariguata, N. H. Cho, D. Cavan, J. E. Shaw, and L. E. Makaroff. 2017. "IDF Diabetes Atlas: Global Estimates for the Prevalence of Diabetes for 2015 and 2040." *Diabetes Research and Clinical Practice* 128 (June): 40–50. doi:10.1016/j.diabres.2017.03.024.
- Ola, M. Shamsul, Deborah A. Berkich, Yuping Xu, M. Todd King, Thomas W. Gardner, Ian Simpson, and Kathryn F. LaNoue. 2006. "Analysis of Glucose Metabolism in Diabetic Rat Retinas." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290 (6): E1057–E1067. doi:10.1152/ajpendo.00323.2005.
- Ola, Mohammad Shamsul, and Kathryn F. LaNoue. 2019. "Molecular Basis for Increased Lactate Formation in the Müller Glial Cells of Retina." *Brain Research Bulletin* 144: 158–163. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.11.023.
- Ola, Mohammad Shamsul, Mohd Imtiaz Nawaz, M. Mairaj Siddiquei, Saleh Al-Amro, and Ahmed M. Abu El-Asrar. 2012. "Recent Advances in Understanding the Biochemical and Molecular Mechanism of Diabetic Retinopathy." *Journal of Diabetes and Its Complications* 26 (1): 56–64. doi:10.1016/j.jdiacomp.2011.11.004.
- Olivares, Ana Maria, Kristen Althoff, Gloria Fanghua Chen, Siqi Wu, Margaux A. Morrisson, Margaret M. DeAngelis, and Neena Haider. 2017. "Animal Models of Diabetic Retinopathy." *Current Diabetes Reports* 17 (10). doi:10.1007/s11892-017-0913-0.
- Olsen, Timothy W., Scott Sanderson, Xiao Feng, and William C. Hubbard. 2002. "Porcine Sclera: Thickness and Surface Area." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (8): 2529–2532.
- Osborne, Andrew, Marina Hopes, Phillip Wright, David C. Broadway, and Julie Sanderson. 2016. "Human Organotypic Retinal Cultures (HORCs) as a Chronic Experimental Model for Investigation of Retinal Ganglion Cell Degeneration." *Experimental Eye Research* 143 (February): 28–38. doi:10.1016/j.exer.2015.09.012.
- Pannicke, Thomas, Ianors Iandiev, Antje Wurm, Ortrud Uckermann, Franziska vom Hagen, Andreas Reichenbach, Peter Wiedemann, Hans-Peter Hammes, and Andreas Bringmann. 2006. "Diabetes Alters Osmotic Swelling Characteristics and Membrane Conductance of Glial Cells in Rat Retina." *Diabetes* 55 (3): 633–639. doi:10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1349.
- Pasha, Sheik Pran Babu Sardar, Robert Münch, Patrick Schäfer, Peter Oertel, Alex M. Sykes, Yiqing Zhu, and Mike O. Karl. 2017. "Retinal Cell Death Dependent

- Reactive Proliferative Gliosis in the Mouse Retina." *Scientific Reports* 7 (1): 1–16. doi:10.1038/s41598-017-09743-8.
- Paul, Debasish, Avinash Kumar, Akshada Gajbhiye, Manas K. Santra, and Rapole Srikanth. 2013. "Mass Spectrometry-Based Proteomics in Molecular Diagnostics: Discovery of Cancer Biomarkers Using Tissue Culture." Research article. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2013/783131.
- Petit, Lolita, Shan Ma, Joris Cipi, Shun-Yun Cheng, Marina Zieger, Nissim Hay, and Claudio Punzo. 2018. "Aerobic Glycolysis Is Essential for Normal Rod Function and Controls Secondary Cone Death in Retinitis Pigmentosa." *Cell Reports* 23 (9): 2629–2642. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.111.
- Peyman, Gholam A., Eleonora M. Lad, and Darius M. Moshfeghi. 2009. "Intravitreal Injection of Therapeutic Agents." *Retina (Philadelphia, Pa.)* 29 (7): 875–912. doi:10.1097/IAE.0b013e3181a94f01.
- Peynshaert, Karen, Joke Devoldere, Valérie Forster, Serge Picaud, Christian Vanhove, Stefaan C. De Smedt, and Katrien Remaut. 2017. "Toward Smart Design of Retinal Drug Carriers: A Novel Bovine Retinal Explant Model to Study the Barrier Role of the Vitreoretinal Interface." *Drug Delivery* 24 (1): 1384–1394. doi:10.1080/10717544.2017.1375578.
- Pinzón-Duarte, G., K. Kohler, B. Arango-González, and E. Guenther. 2000. "Cell Differentiation, Synaptogenesis, and Influence of the Retinal Pigment Epithelium in a Rat Neonatal Organotypic Retina Culture." *Vision Research* 40 (25): 3455–3465. doi:10.1016/s0042-6989(00)00185-1.
- Pociot, F., and M. F. McDermott. 2002. "Genetics of Type 1 Diabetes Mellitus." *Genes & Immunity* 3 (5): 235–249. doi:10.1038/sj.gene.6363875.
- Poitry-Yamate, C. L., S. Poitry, and M. Tsacopoulos. 1995. "Lactate Released by Muller Glial Cells Is Metabolized by Photoreceptors from Mammalian Retina." *Journal of Neuroscience* 15 (7): 5179–5191. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-07-05179.1995.
- Poitry-Yamate, C., and M. Tsacopoulos. 1991. "Glial (Müller) Cells Take up and Phosphorylate [³H]2-Deoxy-D-Glucose in Mammalian Retina." *Neuroscience Letters* 122 (2): 241–244. doi:10.1016/0304-3940(91)90868-t.
- Ponsioen, Theodorus L., Marja J.A. van Luyn, Roelofje J. van der Worp, Hendri H. Pas, Johanna M.M. Hooymans, and Leonoor I. Los. 2008. "Human Retinal Müller Cells Synthesize Collagens of the Vitreous and Vitreoretinal Interface in Vitro." *Molecular Vision* 14 (March): 652–660.
- Pontes, Arthur H., and Marcelo V. de Sousa. 2016. "Mass Spectrometry-Based Approaches to Understand the Molecular Basis of Memory." *Frontiers in Chemistry* 4 (October). doi:10.3389/fchem.2016.00040.
- Pow, D. V., and D. K. Crook. 1995. "Immunocytochemical Evidence for the Presence of High Levels of Reduced Glutathione in Radial Glial Cells and Horizontal

- Cells in the Rabbit Retina." *Neuroscience Letters* 193 (1): 25–28.
doi:10.1016/0304-3940(95)11657-i.
- Provis, J. M. 2001. "Development of the Primate Retinal Vasculature." *Progress in Retinal and Eye Research* 20 (6): 799–821.
- Qi, Yifei, and Ren Xu. 2018. "Roles of PLODs in Collagen Synthesis and Cancer Progression." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6.
doi:10.3389/fcell.2018.00066.
- Rakieten, N., M. L. Rakieten, and M. V. Nadkarni. 1963. "Studies on the Diabetogenic Action of Streptozotocin (NSC-37917)." *Cancer Chemotherapy Reports* 29 (May): 91–98.
- Raman, Rajiv, Muneeswar Gupta Nittala, Laxmi Gella, Swakshyar Saumya Pal, and Tarun Sharma. 2015. "Retinal Sensitivity over Hard Exudates in Diabetic Retinopathy." *Journal of Ophthalmic & Vision Research* 10 (2): 160–164.
doi:10.4103/2008-322X.163771.
- Rao, Shreyas B., Shirin Katozi, Nadia Skauli, Stanley C. Froehner, Ole Petter Ottersen, Marvin E. Adams, and Mahmood Amiry-Moghaddam. 2019. "Targeted Deletion of B1-Syntrophin Causes a Loss of Kir 4.1 from Müller Cell Endfeet in Mouse Retina." *Glia* 67 (6): 1138–1149. doi:10.1002/glia.23600.
- Reichenbach, Andreas, and Andreas Bringmann. 2013. "New Functions of Müller Cells." *Glia* 61 (5): 651–678. doi:10.1002/glia.22477.
- Reichenbach, Andreas, Antje Wurm, Thomas Pannicke, Ianors landiev, Peter Wiedemann, and Andreas Bringmann. 2007. "Müller Cells as Players in Retinal Degeneration and Edema." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 245 (5): 627–636. doi:10.1007/s00417-006-0516-y.
- Reinhard, Jacqueline, Stephanie C. Joachim, and Andreas Faissner. 2015. "Extracellular Matrix Remodeling during Retinal Development." *Experimental Eye Research* 133 (April): 132–140. doi:10.1016/j.exer.2014.07.001.
- Renner, Simone, Andreas Blutke, Sebastian Clauss, Cornelia A. Deeg, Elisabeth Kemter, Daphne Merkus, Rüdiger Wanke, and Eckhard Wolf. 2020. "Porcine Models for Studying Complications and Organ Crosstalk in Diabetes Mellitus." *Cell and Tissue Research*, January. doi:10.1007/s00441-019-03158-9.
- Renner, Simone, Christina Braun-Reichhart, Andreas Blutke, Nadja Herbach, Daniela Emrich, Elisabeth Streckel, Annegret Wünsch, et al. 2013. "Permanent Neonatal Diabetes in INSC94Y Transgenic Pigs." *Diabetes* 62 (5): 1505–1511.
doi:10.2337/db12-1065.
- Rettinger, Christina L., and Heuy-Ching Wang. 2018. "Quantitative Assessment of Retina Explant Viability in a Porcine Ex Vivo Neuroretina Model." *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: The Official Journal of the*

- Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 34 (7): 521–530.
doi:10.1089/jop.2018.0021.
- Roche, Sarah L., Ana M. Ruiz-Lopez, Jennifer N. Moloney, Ashleigh M. Byrne, and Thomas G. Cotter. 2018. "Microglial-Induced Müller Cell Gliosis Is Attenuated by Progesterone in a Mouse Model of Retinitis Pigmentosa." *Glia* 66 (2): 295–310. doi:10.1002/glia.23243.
- Roy, Sayon, Shruti Amin, and Sumon Roy. 2016. "Retinal Fibrosis in Diabetic Retinopathy." *Experimental Eye Research* 142 (January): 71–75.
doi:10.1016/j.exer.2015.04.004.
- Rueda, Elda M., Jerry E. Johnson, Anand Giddabasappa, Anand Swaroop, Matthew J. Brooks, Irena Sigel, Shawnta Y. Chaney, and Donald A. Fox. 2016. "The Cellular and Compartmental Profile of Mouse Retinal Glycolysis, Tricarboxylic Acid Cycle, Oxidative Phosphorylation, and ~P Transferring Kinases." *Molecular Vision* 22: 847–885.
- Ruiz-Ederra, Javier, Monica García, David Hicks, and Elena Vecino. 2004. "Comparative Study of the Three Neurofilament Subunits within Pig and Human Retinal Ganglion Cells." *Molecular Vision* 10 (February): 83–92.
- Rungger-Brändle, E., A. A. Dosso, and P. M. Leuenberger. 2000. "Glial Reactivity, an Early Feature of Diabetic Retinopathy." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (7): 1971–1980.
- Ruzafa, Noelia, Xandra Pereiro, Patricia Aspichueta, Javier Araiz, and Elena Vecino. 2018. "The Retina of Osteopontin Deficient Mice in Aging." *Molecular Neurobiology* 55 (1): 213–221. doi:10.1007/s12035-017-0734-9.
- Ruzafa, Noelia, Xandra Pereiro, Marlen F. Lepper, Stefanie M. Hauck, and Elena Vecino. 2018. "A Proteomics Approach to Identify Candidate Proteins Secreted by Müller Glia That Protect Ganglion Cells in the Retina." *Proteomics* 18 (11): e1700321. doi:10.1002/pmic.201700321.
- Ruzafa, Noelia, Carmen Rey-Santano, Victoria Mielgo, Xandra Pereiro, and Elena Vecino. 2017. "Effect of Hypoxia on the Retina and Superior Colliculus of Neonatal Pigs." *PLOS ONE* 12 (4): e0175301.
doi:10.1371/journal.pone.0175301.
- Sacconi, Riccardo, Chiara Giuffrè, Eleonora Corbelli, Enrico Borrelli, Giuseppe Querques, and Francesco Bandello. 2019. "Emerging Therapies in the Management of Macular Edema: A Review." *F1000Research* 8 (August).
doi:10.12688/f1000research.19198.1.
- Sadygov, Rovshan G, Daniel Cociorva, and John R Yates. 2004. "Large-Scale Database Searching Using Tandem Mass Spectra: Looking up the Answer in the Back of the Book." *Nature Methods* 1 (3): 195–202.
doi:10.1038/nmeth725.
- Safi, Sher Zaman, Rajes Qvist, Selva Kumar, Kalaivani Batumalaie, and Ikram Shah Bin Ismail. 2014. "Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General

- Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets.” *BioMed Research International* 2014. doi:10.1155/2014/801269.
- Sakami, Sanae, Yoshikazu Imanishi, and Krzysztof Palczewski. 2018. “Müller Glia Phagocytose Dead Photoreceptor Cells in a Mouse Model of Retinal Degenerative Disease.” *The FASEB Journal* 33 (3): 3680–3692. doi:10.1096/fj.201801662R.
- Sanchez, Irene, Raul Martin, Fernando Ussa, and Ivan Fernandez-Bueno. 2011. “The Parameters of the Porcine Eyeball.” *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 249 (4): 475–482. doi:10.1007/s00417-011-1617-9.
- Santiago, Ambrosio. 2009. “Diabetes Decreases Glycolysis in the Rat Retina.” *Frontiers in Neuroscience* 3. doi:10.3389/conf.neuro.01.2009.11.085.
- Saveliev, Sergei, Mark Bratz, Roman Zubarev, Matt Szapacs, Harshavardhan Budamgunta, and Marjeta Urh. 2013. “Trypsin/Lys-C Protease Mix for Enhanced Protein Mass Spectrometry Analysis.” *Nature Methods* 10 (11): i–ii. doi:10.1038/nmeth.f.371.
- Scheltema, Richard Alexander, Jan-Peter Hauschild, Oliver Lange, Daniel Hornburg, Eduard Denisov, Eugen Damoc, Andreas Kuehn, Alexander Makarov, and Matthias Mann. 2014. “The Q Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-Filter, High-Performance Quadrupole and an Ultra-High-Field Orbitrap Analyzer.” *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (12): 3698–3708. doi:10.1074/mcp.M114.043489.
- Schlotterer, Andrea, Matthias Kolibabka, Jihong Lin, Kübra Acunman, Nadine Dietrich, Carsten Sticht, Thomas Fleming, Peter Nawroth, and Hans-Peter Hammes. 2018. “Methylglyoxal Induces Retinopathy-Type Lesions in the Absence of Hyperglycemia: Studies in a Rat Model.” *The FASEB Journal* 33 (3): 4141–4153. doi:10.1096/fj.201801146RR.
- Schmidt-Erfurth, Ursula, Jose Garcia-Arumi, Francesco Bandello, Karina Berg, Usha Chakravarthy, Bianca S. Gerendas, Jost Jonas, Michael Larsen, Ramin Tadayoni, and Anat Loewenstein. 2017. “Guidelines for the Management of Diabetic Macular Edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA).” *Ophthalmologica* 237 (4): 185–222. doi:10.1159/000458539.
- Schnabolk, Gloriane, Kimberly Stauffer, Elizabeth O’Quinn, Beth Coughlin, Kannan Kunchithapautham, and Bärbel Rohrer. 2014. “A Comparative Analysis of C57BL/6J and 6N Substrains; Chemokine/Cytokine Expression and Susceptibility to Laser-Induced Choroidal Neovascularization.” *Experimental Eye Research* 129 (December): 18–23. doi:10.1016/j.exer.2014.10.005.
- Schnichels, Sven, Tobias Kiebler, José Hurst, Ana M. Maliha, Marina Löscher, H. Burkhard Dick, Karl-Ulrich Bartz-Schmidt, and Stephanie C. Joachim. 2019. “Retinal Organ Cultures as Alternative Research Models.” *Alternatives to Laboratory Animals* 47 (1): 19–29. doi:10.1177/0261192919840092.

- Schultz, Rowena, Melanie Krug, Michel Precht, Stefanie G. Wohl, Otto W. Witte, and Christian Schmeer. 2018. "Frataxin Overexpression in Müller Cells Protects Retinal Ganglion Cells in a Mouse Model of Ischemia/Reperfusion Injury in Vivo." *Scientific Reports* 8 (1): 1–15. doi:10.1038/s41598-018-22887-5.
- Schütte, M., and P. Werner. 1998. "Redistribution of Glutathione in the Ischemic Rat Retina." *Neuroscience Letters* 246 (1): 53–56. doi:10.1016/s0304-3940(98)00229-8.
- Shen, Weiyong, Marcus Fruttiger, Ling Zhu, Sook H. Chung, Nigel L. Barnett, Joshua K. Kirk, SoRa Lee, et al. 2012. "Conditional Müllercell Ablation Causes Independent Neuronal and Vascular Pathologies in a Novel Transgenic Model." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (45): 15715–15727. doi:10.1523/JNEUROSCI.2841-12.2012.
- Singh, Purva, Cara Carraher, and Jean E. Schwarzbauer. 2010. "Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1): 397–419. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.
- Skatchkov, S. N., M. J. Eaton, Y. M. Shuba, Y. V. Kucheryavykh, C. Derst, R. W. Veh, A. Wurm, et al. 2006. "Tandem-Pore Domain Potassium Channels Are Functionally Expressed in Retinal (Müller) Glial Cells." *Glia* 53 (3): 266–276. doi:10.1002/glia.20280.
- Skytt, D. M., A. K. Toft-Kehler, C. T. Brændstrup, S. Cejvanovic, I. S. Gurubaran, L. H. Bergersen, and M. Kolko. 2016. "Glia-Neuron Interactions in the Retina Can Be Studied in Cocultures of Müller Cells and Retinal Ganglion Cells." Research article. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2016/1087647.
- Slijkerman, Ralph W. N., Fei Song, Galuh D. N. Astuti, Martijn A. Huynen, Erwin van Wijk, Knut Stieger, and Rob W. J. Collin. 2015. "The Pros and Cons of Vertebrate Animal Models for Functional and Therapeutic Research on Inherited Retinal Dystrophies." *Progress in Retinal and Eye Research* 48 (September): 137–159. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.04.004.
- Smedowski, Adrian, Marita Pietrucha-Dutczak, Ruchi Maniar, Michael Ajeleti, Iwona Matuszek, and Joanna Lewin-Kowalik. 2018. "FluoroGold-Labeled Organotypic Retinal Explant Culture for Neurotoxicity Screening Studies." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 2487473. doi:10.1155/2018/2487473.
- Smith, Sylvia B., Jennifer Duplantier, Ying Dun, Barbara Mysona, Penny Roon, Pamela M. Martin, and Vadivel Ganapathy. 2008. "In Vivo Protection against Retinal Neurodegeneration by Sigma Receptor 1 Ligand (+)-Pentazocine." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (9): 4154–4161. doi:10.1167/iovs.08-1824.
- Sohn, Elliott H., Hille W. van Dijk, Chunhua Jiao, Pauline H. B. Kok, Woojin Jeong, Nazli Demirkaya, Allison Garmager, et al. 2016. "Retinal Neurodegeneration May Precede Microvascular Changes Characteristic of Diabetic Retinopathy in Diabetes Mellitus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* 113 (19): E2655-2664.
doi:10.1073/pnas.1522014113.
- Sommer, Jeffrey R., Jose L. Estrada, Edwin B. Collins, Matthew Bedell, Curtis A. Alexander, Zhenglin Yang, Guy Hughes, et al. 2011. "Production of ELOVL4 Transgenic Pigs: A Large Animal Model for Stargardt-like Macular Degeneration." *The British Journal of Ophthalmology* 95 (12): 1749–1754.
doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300417.
- Song, Brian J., Lloyd Paul Aiello, and Louis R. Pasquale. 2016. "Presence and Risk Factors for Glaucoma in Patients with Diabetes." *Current Diabetes Reports* 16 (12): 124. doi:10.1007/s11892-016-0815-6.
- Spaide, Richard F. 2016. "RETINAL VASCULAR CYSTOID MACULAR EDEMA: Review and New Theory." *Retina (Philadelphia, Pa.)* 36 (10): 1823–1842.
doi:10.1097/IAE.0000000000001158.
- Stefánsson, E., Y. K. Chan, T. Bek, S. H. Hardarson, D. Wong, and D. I. Wilson. 2018. "Laws of Physics Help Explain Capillary Non-Perfusion in Diabetic Retinopathy." *Eye (London, England)* 32 (2): 210–212.
doi:10.1038/eye.2017.313.
- Stewart, Michael W. 2016. "Treatment of Diabetic Retinopathy: Recent Advances and Unresolved Challenges." *World Journal of Diabetes* 7 (16): 333–341.
doi:10.4239/wjd.v7.i16.333.
- Stone, J., J. Maslim, K. Valter-Kocsi, K. Mervin, F. Bowers, Y. Chu, N. Barnett, et al. 1999. "Mechanisms of Photoreceptor Death and Survival in Mammalian Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 18 (6): 689–735.
- Stradleigh, Tyler W., and Andrew T. Ishida. 2015. "Fixation Strategies For Retinal Immunohistochemistry." *Progress in Retinal and Eye Research* 48 (September): 181–202. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.04.001.
- Strauss, Olaf. 2005. "The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function." *Physiological Reviews* 85 (3): 845–881. doi:10.1152/physrev.00021.2004.
- Subirada, Paula V., María C. Paz, Magali E. Ridano, Valeria E. Lorenc, María V. Vaglianti, Pablo F. Barcelona, José D. Luna, and María C. Sánchez. 2018. "A Journey into the Retina: Müller Glia Commanding Survival and Death." *The European Journal of Neuroscience* 47 (12): 1429–1443.
doi:10.1111/ejn.13965.
- Swarup, Aditi, Ivy S. Samuels, Brent A. Bell, John Y. S. Han, Jianhai Du, Erik Massenzio, E. Dale Abel, Kathleen Boesze-Battaglia, Neal S. Peachey, and Nancy J. Philp. 2019. "Modulating GLUT1 Expression in Retinal Pigment Epithelium Decreases Glucose Levels in the Retina: Impact on Photoreceptors and Müller Glial Cells." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 316 (1): C121–C133. doi:10.1152/ajpcell.00410.2018.
- Syrbe, Steffen, Heidrun Kuhrt, Ulrich Gärtner, Gunnar Habermann, Peter Wiedemann, Andreas Bringmann, and Andreas Reichenbach. 2018. "Müller

- Glial Cells of the Primate Foveola: An Electron Microscopical Study.” *Experimental Eye Research* 167 (February): 110–117. doi:10.1016/j.exer.2017.12.004.
- Szklarczyk, Damian, Annika L. Gable, David Lyon, Alexander Junge, Stefan Wyder, Jaime Huerta-Cepas, Milan Simonovic, et al. 2019. “STRING V11: Protein-Protein Association Networks with Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome-Wide Experimental Datasets.” *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D607–D613. doi:10.1093/nar/gky1131.
- Szober, Christoph, Stefanie Hauck, Kerstin Euler, Kristina Fröhlich, Claudia Alge-Priglinger, Marius Ueffing, and Cornelia Deeg. 2012. “Profound Re-Organization of Cell Surface Proteome in Equine Retinal Pigment Epithelial Cells in Response to In Vitro Culturing.” *International Journal of Molecular Sciences* 13 (12): 14053–14072. doi:10.3390/ijms131114053.
- Takata, K., T. Kasahara, M. Kasahara, O. Ezaki, and H. Hirano. 1992. “Ultracytochemical Localization of the Erythrocyte/HepG2-Type Glucose Transporter (GLUT1) in Cells of the Blood-Retinal Barrier in the Rat.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 33 (2): 377–383.
- Tang, J., X. W. Zhu, W. D. Lust, and T. S. Kern. 2000. “Retina Accumulates More Glucose than Does the Embryologically Similar Cerebral Cortex in Diabetic Rats.” *Diabetologia* 43 (11): 1417–1423. doi:10.1007/s001250051548.
- Tang, Jie, Yunpeng Du, J. Mark Petrash, Nader Sheibani, and Timothy S. Kern. 2013. “Deletion of Aldose Reductase from Mice Inhibits Diabetes-Induced Retinal Capillary Degeneration and Superoxide Generation.” *PloS One* 8 (4): e62081. doi:10.1371/journal.pone.0062081.
- Tansley, Katharine. 1933. “THE FORMATION OF ROSETTES IN THE RAT RETINA.” *The British Journal of Ophthalmology* 17 (6): 321–336.
- Tavares Ferreira, Joana, Rita Proença, Marta Alves, Arnaldo Dias-Santos, Bruno Oliveira Santos, João Paulo Cunha, Ana Luísa Papoila, and Luís Abegão Pinto. 2017. “Retina and Choroid of Diabetic Patients Without Observed Retinal Vascular Changes: A Longitudinal Study.” *American Journal of Ophthalmology* 176 (April): 15–25. doi:10.1016/j.ajo.2016.12.023.
- Taylor, Linnéa, Karin Arnér, and Fredrik Ghosh. 2016. “N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Neuronal Cell Death in a Large Animal Model of Retinal Degeneration in Vitro.” *Experimental Eye Research* 148: 55–64. doi:10.1016/j.exer.2016.05.023.
- Taylor, Linnéa, Karin Arnér, Martin Kolewe, Christopher Pritchard, Gillian Hendy, Robert Langer, and Fredrik Ghosh. 2017. “Seeing through the Interface: Poly(ϵ -Caprolactone) Surface Modification of Poly(Glycerol-Co-Sebacic Acid) Membranes in Adult Porcine Retinal Explants.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11 (8): 2349–2358. doi:10.1002/term.2135.
- Taylor, Linnéa, Karin Arnér, Ingrid Holmgren Taylor, and Fredrik Ghosh. 2014. “Feet on the Ground: Physical Support of the Inner Retina Is a Strong Determinant

- for Cell Survival and Structural Preservation in Vitro.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55 (4): 2200–2213. doi:10.1167/iovs.13-13535.
- Taylor, Linnéa, Damian Moran, Karin Arnér, Eric Warrant, and Fredrik Ghosh. 2013. “Stretch to See: Lateral Tension Strongly Determines Cell Survival in Long-Term Cultures of Adult Porcine Retina.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (3): 1845–1856. doi:10.1167/iovs.12-11420.
- Teuscher, Alina C., Elisabeth Jongsma, Martin N. Davis, Cyril Statzer, Jan M. Gebauer, Alexandra Naba, and Collin Y. Ewald. 2019. “The In-Silico Characterization of the Caenorhabditis Elegans Matrisome and Proposal of a Novel Collagen Classification.” *Matrix Biology Plus* 1 (February): 100001. doi:10.1016/j.mbplus.2018.11.001.
- Toh, Huishi, Alexander Smolentsev, Rachel V. Bozadjian, Patrick W. Keeley, Madison D. Lockwood, Ryan Sadjadi, Dennis O. Clegg, et al. 2019. *Vascular Changes in Diabetic Retinopathy—a Longitudinal Study in the Nile Rat*. Report. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41374-019-0264-3.
- Toops, Kimberly A., Cynthia Berlinicke, Donald J. Zack, and Robert W. Nickells. 2012. “Hydrocortisone Stimulates Neurite Outgrowth from Mouse Retinal Explants by Modulating Macrogial Activity.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (4): 2046–2061. doi:10.1167/iovs.11-8646.
- Trachsel-Moncho, Laura, Soledad Benlloch-Navarro, Ángel Fernández-Carbonell, Dolores Tania Ramírez-Lamelas, Teresa Olivar, Dolores Silvestre, Enric Poch, and María Miranda. 2018. “Oxidative Stress and Autophagy-Related Changes during Retinal Degeneration and Development.” *Cell Death & Disease* 9 (8): 812. doi:10.1038/s41419-018-0855-8.
- Tran, Quangdon, Hyunji Lee, Jisoo Park, Seon-Hwan Kim, and Jongsun Park. 2016. “Targeting Cancer Metabolism - Revisiting the Warburg Effects.” *Toxicological Research* 32 (3): 177–193. doi:10.5487/TR.2016.32.3.177.
- Traverso, Vale´rie, Norbert Kinkl, Lena Grimm, Jose´ Sahel, and David Hicks. 2003. “Basic Fibroblast and Epidermal Growth Factors Stimulate Survival in Adult Porcine Photoreceptor Cell Cultures.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (10): 4550. doi:10.1167/iovs.03-0460.
- Tyanova, Stefka, Tikira Temu, Pavel Sinitcyn, Arthur Carlson, Marco Y. Hein, Tamar Geiger, Matthias Mann, and Jürgen Cox. 2016. “The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote)Omics Data.” *Nature Methods* 13 (9): 731–740. doi:10.1038/nmeth.3901.
- Uhl, P.B., C.M. Szober, B. Amann, C. Alge-Priglinger, M. Ueffing, S.M. Hauck, and C.A. Deeg. 2014. “In Situ Cell Surface Proteomics Reveals Differentially Expressed Membrane Proteins in Retinal Pigment Epithelial Cells during Autoimmune Uveitis.” *Journal of Proteomics* 109 (September): 50–62. doi:10.1016/j.jprot.2014.06.020.

- Urban, Pawel L. 2016. "Quantitative Mass Spectrometry: An Overview." *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences* 374 (2079). doi:10.1098/rsta.2015.0382.
- Valdés, Joaquín, Laura Trachsel-Moncho, Ayse Sahaboglu, Dragana Trifunović, María Miranda, Marius Ueffing, François Paquet-Durand, and Oliver Schmachtenberg. 2016. "Organotypic Retinal Explant Cultures as in Vitro Alternative for Diabetic Retinopathy Studies." *ALTEX* 33 (4): 459–464. doi:10.14573/altex.1603111.
- van Agthoven, Maria A., Yuko P. Y. Lam, Peter B. O'Connor, Christian Rolando, and Marc-André Delsuc. 2019. "Two-Dimensional Mass Spectrometry: New Perspectives for Tandem Mass Spectrometry." *European Biophysics Journal* 48 (3): 213–229. doi:10.1007/s00249-019-01348-5.
- van de Merbel, Nico C. 2019. "Protein Quantification by LC–MS: A Decade of Progress through the Pages of Bioanalysis." *Bioanalysis* 11 (7): 629–644. doi:10.4155/bio-2019-0032.
- van der Valk, J., D. Brunner, K. De Smet, Å. Fex Svenningsen, P. Honegger, L.E. Knudsen, T. Lindl, et al. 2010. "Optimization of Chemically Defined Cell Culture Media – Replacing Fetal Bovine Serum in Mammalian in Vitro Methods." *Toxicology in Vitro* 24 (4): 1053–1063. doi:10.1016/j.tiv.2010.03.016.
- van Dijk, Hille W., Frank D. Verbraak, Pauline H. B. Kok, Marilette Stehouwer, Mona K. Garvin, Milan Sonka, J. Hans DeVries, Reinier O. Schlingemann, and Michael D. Abramoff. 2012. "Early Neurodegeneration in the Retina of Type 2 Diabetic Patients." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (6): 2715–2719. doi:10.1167/iovs.11-8997.
- Vecino, E., J. Ruiz–Ederra, M. Hernández, J. A. Urcola, J. Araiz, J. Durán, and M. García. 2004. "Topography Of Retinal Ganglion Cells Of The Pig Retina – Cell Size Distribution." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45 (13): 5434–5434.
- Vecino, Elena, F. David Rodriguez, Noelia Ruzafa, Xandra Pereiro, and Sansar C. Sharma. 2016. "Glia–Neuron Interactions in the Mammalian Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 51 (March): 1–40. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.003.
- Virchow, Rudolf (Rudolf Ludwig Karl). 1856. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin [electronic resource]*. Frankfurt A. M. : Meidinger Sohn & Comp. <http://archive.org/details/b21462161>.
- Vogler, Stefanie, Antje Grosche, Thomas Pannicke, Peter Wiedemann, Andreas Reichenbach, and Andreas Bringmann. 2016. "Endothelins Inhibit Osmotic Swelling of Rat Retinal Glial and Bipolar Cells by Activation of Growth Factor Signaling." *Neurochemical Research* 41 (10): 2598–2606. doi:10.1007/s11064-016-1971-4.

- von Toerne, Christine, Jacob Menzler, Alice Ly, Nicole Senninger, Marius Ueffing, and Stefanie M. Hauck. 2014. "Identification of a Novel Neurotrophic Factor from Primary Retinal Müller Cells Using Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (9): 2371–2381. doi:10.1074/mcp.M113.033613.
- Vujosevic, Stela, Alessandra Micera, Silvia Bini, Marianna Berton, Graziana Esposito, and Edoardo Midena. 2016. "Proteome Analysis of Retinal Glia Cells-Related Inflammatory Cytokines in the Aqueous Humour of Diabetic Patients." *Acta Ophthalmologica* 94 (1): 56–64. doi:10.1111/aos.12812.
- Vujosevic, Stela, and Edoardo Midena. 2013. "Retinal Layers Changes in Human Preclinical and Early Clinical Diabetic Retinopathy Support Early Retinal Neuronal and Müller Cells Alterations." *Journal of Diabetes Research* 2013. doi:10.1155/2013/905058.
- Wahl, V., S. Vogler, A. Grosche, T. Pannicke, M. Ueffing, P. Wiedemann, A. Reichenbach, S. M. Hauck, and A. Bringmann. 2013. "Osteopontin Inhibits Osmotic Swelling of Retinal Glial (Müller) Cells by Inducing Release of VEGF." *Neuroscience* 246 (August): 59–72. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.045.
- Wang, Jianfeng, Anton M. Kolomeyer, Marco A. Zarbin, and Ellen Townes-Anderson. 2011. "Organotypic Culture of Full-Thickness Adult Porcine Retina." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 49 (March). doi:10.3791/2655.
- Wang, Jingjing, Matthew L. O'Sullivan, Dibyendu Mukherjee, Vanessa M. Puñal, Sina Farsi, and Jeremy N. Kay. 2017. "Anatomy and Spatial Organization of Müller Glia in Mouse Retina." *Journal of Comparative Neurology* 525 (8): 1759–1777. doi:10.1002/cne.24153.
- Wang, Juanjuan, Xueliang Xu, Michael H. Elliott, Meili Zhu, and Yun-Zheng Le. 2010. "Müller Cell-Derived VEGF Is Essential for Diabetes-Induced Retinal Inflammation and Vascular Leakage." *Diabetes* 59 (9): 2297–2305. doi:10.2337/db09-1420.
- Wang, Mingxun, and Nuno Bandeira. 2013. "Spectral Library Generating Function for Assessing Spectrum-Spectrum Match Significance." *Journal of Proteome Research* 12 (9): 3944–3951. doi:10.1021/pr400230p.
- Weijnen, C. F., S. S. Rich, J. B. Meigs, A. S. Krolewski, and J. H. Warram. 2002. "Risk of Diabetes in Siblings of Index Cases with Type 2 Diabetes: Implications for Genetic Studies." *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 19 (1): 41–50. doi:10.1046/j.1464-5491.2002.00624.x.
- Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, et al. 1996. "From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis." *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 14 (1): 61–65.
- Wilkins, M. R., Jean-Charles Sanchez, Andrew A. Gooley, Ron D. Appel, Ian Humphery-Smith, Denis F. Hochstrasser, and Keith L. Williams. 1996. "Progress with Proteome Projects: Why All Proteins Expressed by a Genome

- Should Be Identified and How To Do It." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 13 (1): 19–50. doi:10.1080/02648725.1996.10647923.
- Wilkinson, C. P., Frederick L. Ferris, Ronald E. Klein, Paul P. Lee, Carl David Agardh, Matthew Davis, Diana Dills, et al. 2003. "Proposed International Clinical Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema Disease Severity Scales." *Ophthalmology* 110 (9): 1677–1682. doi:10.1016/S0161-6420(03)00475-5.
- Winkler, B. S., M. J. Arnold, M. A. Brassell, and D. G. Puro. 2000. "Energy Metabolism in Human Retinal Müller Cells." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (10): 3183–3190.
- Winkler, Barry S., Roberta G. Pourcho, Catherine Starnes, Jessica Slocum, and Nicklaus Slocum. 2003. "Metabolic Mapping in Mammalian Retina: A Biochemical and ³H-2-Deoxyglucose Autoradiographic Study." *Experimental Eye Research* 77 (3): 327–337. doi:10.1016/s0014-4835(03)00147-7.
- Winkler, B.S., Starnes, C.A., Pourcho, R.G., and Vaughn, D.K. 2005. "Vulnerability of Rods and Cones to Oxidant Stress May Be Linked to Low Levels of Glutathione." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (33).
- Winkler, Jörg, Sebastian Hagelstein, Manfred Rohde, and Horst Laqua. 2002. "Cellular and Cytoskeletal Dynamics within Organ Cultures of Porcine Neuroretina." *Experimental Eye Research* 74 (6): 777–788.
- Wiśniewski, Jacek R., Alexandre Zougman, Nagarjuna Nagaraj, and Matthias Mann. 2009. "Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis." *Nature Methods* 6 (5): 359–362. doi:10.1038/nmeth.1322.
- Wolf, Eckhard, Christina Braun-Reichhart, Elisabeth Streckel, and Simone Renner. 2014. "Genetically Engineered Pig Models for Diabetes Research." *Transgenic Research* 23 (1): 27–38. doi:10.1007/s11248-013-9755-y.
- Wong, Tien Y., Chui Ming Gemmy Cheung, Michael Larsen, Sanjay Sharma, and Rafael Simó. 2016. "Diabetic Retinopathy." *Nature Reviews Disease Primers* 2 (March): 16012. doi:10.1038/nrdp.2016.12.
- Wong, Tien Y., Jennifer Sun, Ryo Kawasaki, Paisan Ruamviboonsuk, Neeru Gupta, Van Charles Lansingh, Mauricio Maia, et al. 2018. "Guidelines on Diabetic Eye Care: The International Council of Ophthalmology Recommendations for Screening, Follow-up, Referral, and Treatment Based on Resource Settings." *Ophthalmology* 125 (10): 1608–1622. doi:10.1016/j.ophtha.2018.04.007.
- Wong, Tien Yin, Ronald Klein, A. Richey Sharrett, Maria I. Schmidt, James S. Pankow, David J. Couper, Barbara E. K. Klein, Larry D. Hubbard, Bruce B. Duncan, and ARIC Investigators. 2002. "Retinal Arteriolar Narrowing and Risk of Diabetes Mellitus in Middle-Aged Persons." *JAMA* 287 (19): 2528–2533. doi:10.1001/jama.287.19.2528.
- Wong-Riley, Margaret T. T. 2010. "Energy Metabolism of the Visual System." *Eye and Brain* 2: 99–116. doi:10.2147/EB.S9078.

- Wurm, Antje, Stephan Lipp, Thomas Pannicke, Regina Linnertz, Katrin Färber, Peter Wiedemann, Andreas Reichenbach, and Andreas Bringmann. 2009. "Involvement of A1 Adenosine Receptors in Osmotic Volume Regulation of Retinal Glial Cells in Mice." *Molecular Vision* 15 (September): 1858–1867.
- Xin, Hua, Jo-Ann S. Yannazzo, R. Scott Duncan, Elaine V. Gregg, Meharvan Singh, and Peter Koulen. 2007. "A Novel Organotypic Culture Model of the Postnatal Mouse Retina Allows the Study of Glutamate-Mediated Excitotoxicity." *Journal of Neuroscience Methods* 159 (1): 35–42.
doi:10.1016/j.jneumeth.2006.06.013.
- Xue, Yunlu, Susan Q. Shen, Jonathan Jui, Alan C. Rupp, Leah C. Byrne, Samer Hattar, John G. Flannery, Joseph C. Corbo, and Vladimir J. Kefalov. 2015. "CRALBP Supports the Mammalian Retinal Visual Cycle and Cone Vision." *The Journal of Clinical Investigation* 125 (2): 727–738. doi:10.1172/JCI79651.
- Yao, Kai, Suo Qiu, Yanbin V. Wang, Silvia J. H. Park, Ethan J. Mohns, Bhupesh Mehta, Xinran Liu, et al. 2018. "Restoration of Vision after de Novo Genesis of Rod Photoreceptors in Mammalian Retinas." *Nature* 560 (7719): 484–488.
doi:10.1038/s41586-018-0425-3.
- Yau, Joanne W. Y., Sophie L. Rogers, Ryo Kawasaki, Ecosse L. Lamoureux, Jonathan W. Kowalski, Toke Bek, Shih-Jen Chen, et al. 2012. "Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy." *Diabetes Care* 35 (3): 556–564. doi:10.2337/dc11-1909.
- Yetkin-Arik, Bahar, Ilse M. C. Vogels, Patrycja Nowak-Sliwinska, Andrea Weiss, Riekelt H. Houtkooper, Cornelis J. F. Van Noorden, Ingeborg Klaassen, and Reinier O. Schlingemann. 2019. "The Role of Glycolysis and Mitochondrial Respiration in the Formation and Functioning of Endothelial Tip Cells during Angiogenesis." *Scientific Reports* 9 (1): 12608. doi:10.1038/s41598-019-48676-2.
- Yokomizo, Hisashi, Yasutaka Maeda, Kyoungmin Park, Allen C. Clermont, Sonia L. Hernandez, Ward Fickweiler, Qian Li, et al. 2019. "Retinol Binding Protein 3 Is Increased in the Retina of Patients with Diabetes Resistant to Diabetic Retinopathy." *Science Translational Medicine* 11 (499): eaau6627.
doi:10.1126/scitranslmed.aau6627.
- You, Zhi-Peng, Yu-Lan Zhang, Ke Shi, Lu Shi, Yue-Zhi Zhang, Yue Zhou, and Chang-yun Wang. 2017. "Suppression of Diabetic Retinopathy with GLUT1 SiRNA." *Scientific Reports* 7 (August). doi:10.1038/s41598-017-07942-x.
- Young, R. W. 1971. "Shedding of Discs from Rod Outer Segments in the Rhesus Monkey." *Journal of Ultrastructure Research* 34 (1): 190–203.
- Zadeh, Jenia Kouchek, Andreas Garcia-Bardon, Erik Kristoffer Hartmann, Norbert Pfeiffer, Wael Omran, Marion Ludwig, Andreas Patzak, Ning Xia, Huige Li, and Adrian Gericke. 2019. "Short-Time Ocular Ischemia Induces Vascular Endothelial Dysfunction and Ganglion Cell Loss in the Pig Retina." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (19).
doi:10.3390/ijms20194685.

- Zalis, Marina C., Sebastian Johansson, and Ulrica Englund-Johansson. 2017. "Immunocytochemical Profiling of Cultured Mouse Primary Retinal Cells." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 65 (4): 223–239. doi:10.1369/0022155416689675.
- Zayas-Santiago, Astrid, Silke Agte, Yomarie Rivera, Jan Benedikt, Elke Ulbricht, Anett Karl, José Dávila, et al. 2014. "Unidirectional Photoreceptor-to-Müller Glia Coupling and Unique K⁺ Channel Expression in Caiman Retina." *PLOS ONE* 9 (5): e97155. doi:10.1371/journal.pone.0097155.
- Zhang, Dongsheng, Qiang Fei, Juan Li, Chuan Zhang, Ye Sun, Chunyan Zhu, Fengzhen Wang, and Yueming Sun. 2016. "2-Deoxyglucose Reverses the Promoting Effect of Insulin on Colorectal Cancer Cells In Vitro." *PLoS ONE* 11 (3). doi:10.1371/journal.pone.0151115.
- Zhang, Jin-Zhong, Ling Gao, Mi Widness, Xia Xi, and Timothy S. Kern. 2003. "Captopril Inhibits Glucose Accumulation in Retinal Cells in Diabetes." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (9): 4001–4005. doi:10.1167/iovs.02-1193.
- Zhang, Y, G Xu, Q Ling, and C Da. 2011. "Expression of Aquaporin 4 and Kir4.1 in Diabetic Rat Retina: Treatment with Minocycline." *Journal of International Medical Research* 39 (2): 464–479. doi:10.1177/147323001103900214.
- Zhang, Yi, Scott B. Ficarro, Shaojuan Li, and Jarrod A. Marto. 2009. "Optimized Orbitrap HCD for Quantitative Analysis of Phosphopeptides." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (8): 1425–1434. doi:10.1016/j.jasms.2009.03.019.
- Zhao, Xiujuan, Yonghao Li, Shaofen Lin, Yu Cai, Jinglin Zhang, Xiling Yu, Hui Yang, et al. 2015. "The Effects of Sonic Hedgehog on Retinal Müller Cells Under High-Glucose Stress." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56 (4): 2773–2782. doi:10.1167/iovs.14-16104.
- Zheng, Xiaoyang, Haven Baker, William S. Hancock, Farah Fawaz, Michael McCaman, and Erno Pungor. 2006. "Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs." *Biotechnology Progress* 22 (5): 1294–1300. doi:10.1021/bp060121o.
- Zhong, Qing, Manish Mishra, and Renu A. Kowluru. 2013. "Transcription Factor Nrf2-Mediated Antioxidant Defense System in the Development of Diabetic Retinopathy." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (6): 3941–3948. doi:10.1167/iovs.13-11598.
- Zhou, Ti, Di Che, Yuqing Lan, Zhenzhen Fang, Jinye Xie, HaiJun Gong, ChaoYang Li, et al. 2016. "Mesenchymal Marker Expression Is Elevated in Müller Cells Exposed to High Glucose and in Animal Models of Diabetic Retinopathy." *Oncotarget* 8 (3): 4582–4594. doi:10.18632/oncotarget.13945.
- Zhu, Xinping, Yan Sun, Zhongping Wang, Weigang Cui, Yuwen Peng, and Ruixi Li. 2012. "Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Its

Receptors in Cultured Retinal Müller Cells Under High Glucose Circumstance." *The Anatomical Record* 295 (3): 532–539.
doi:10.1002/ar.22404.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Cornelia Deeg und Dr. Stefanie Hauck danken. Trotz einiger bürokratischer Hürden haben sie mir eine großartige Stelle für meine Promotion geboten. Die Kombination ihrer Kompetenzbereiche hat mir eine tolle Doktorarbeit zu einem überaus interessanten und vor allem relevanten Forschungsthema in der Biomedizin ermöglicht. Beide haben mich während des gesamten Projekts außerordentlich engagiert betreut. Sei es durch den seitenlangen eMail-Kontakt oder im wöchentlichen Jour Fixe, sie waren „rund um die Uhr“ für mich zu erreichen. Dabei standen sie mir mit Rat und Tat zur Seite. Trotzdem habe ich die seltene Freiheit genossen, meine eigenen Ideen einzubringen und dieses Projekt zu „meinem Projekt“ zu machen.

Auch beim gesamten Team der Research Unit Protein Science des Helmholtz Zentrums München bedanke ich mich vielmals. Die Welt der Massenspektrometrie wird nicht die meine bleiben, aber es waren tolle Jahre in denen ich viel gelernt habe. Vor allem bei meinen Kolleginnen Dr. Agnese Petrer und Dr. Juliane Merl-Pham bedanke ich mich für ihre ganz besondere fachliche und persönliche Unterstützung für das Paper. Danke auch an Fabian Gruhn und Jen Behler, die mit viel „Geduld und Spucke“ die Defizite einer Tierärztin in Sachen Laborerfahrung auszubügeln vermochten. Ich erwarte demnächst mein Blümchen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Barbara Amann, Sieglinde Hirmer und Claudia Barfüßer, mit denen ich stets über alle Themen rund um die Netzhaut fachsimpeln konnte. Die wertvollen Tipps und Tricks sowie eure aktive Mitarbeit beim Einbetten, Schneiden und Färben waren mir eine tolle Hilfe. Insbesondere bedanke ich mich für die großartige Unterstützung in allen mikroskopischen Belangen bei Barbara Amann, die mich mit ihrer riesigen Erfahrung stets verblüffte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen MitdoktorantInnen und Roxane Degroote, die mich herzlich aufgenommen und mir die Kurstage versüßt haben.

Ich danke außerdem Dr. Annette Feuchtinger der Core Facility für Pathologie des Helmholtz Zentrums München für die tolle Möglichkeit, das Kryostat zu nutzen.

Darüber hinaus danke ich dem Team des Schlachthofs München für unzählige und stets amüsante Übergaben der Schweineaugen in noch so früher Morgenstunde.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Michael von ganzem Herzen danken. Für alles.