

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

Charakterisierung der Müllerzelle
im Rahmen der equinen rezidivierenden Uveitis
sowie nach pro-inflammatorischer Stimulation

von Lea Maria Lorenz, geb. Wilhelmy
aus Wörth an der Donau

München 2022

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

Lehrstuhl für Physiologie

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/en: Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring
Univ.-Prof. Dr. Nikolai Klymiuk
Univ.-Prof. Dr. Nikolai T. Siegel
Univ.-Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 12. Februar 2022

*Meinem Mann Lukas
und meiner Familie*

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	Müllerzellen der Retina	3
2.1.1	Morphologie	3
2.1.2	Physiologische Eigenschaften und Funktionen.....	5
2.1.3	Müllerzell-Gliose	10
2.2	Immunologie des Auges	12
2.2.1	Immunprivileg des Auges.....	12
2.2.2	Immunzellen der Retina	14
2.3	Equine rezidivierende Uveitis	17
2.3.1	Definition und Vorkommen.....	17
2.3.2	Ätiologie und Pathogenese	18
2.3.3	Klinisches und pathohistologisches Bild	19
2.3.4	Rolle der Müllerzellen	20
2.4	Autoimmune Uveitis des Menschen und Tiermodelle	21
2.5	Differenzielle Proteomanalyse	24
2.6	Bedeutung von Membranproteinen	26
2.6.1	Massenspektrometrische Untersuchung von Membranproteinen	26
2.6.2	Bedeutung der Sialinsäuren.....	27
3	PUBLIKATION I	29
4	PUBLIKATION II	43
5	DISKUSSION	63
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	SUMMARY	87
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
	DANKSAGUNG	119

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAID	<i>engl.</i> anterior chamber-associated immune deviation
AIRE	Autoimmun-Regulator
α -MSH	<i>engl.</i> alpha-melanocyte-stimulating hormone
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>engl.</i> brain-derived neurotrophic factor
BRS	Blut-Retina-Schranke
Ca ²⁺	Calcium
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRALBP	Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (<i>engl.</i> cellular retinaldehyde-binding protein)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
DTH	Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion (<i>engl.</i> delayed type hypersensitivity)
DZ	Dendritische Zellen
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
ELISA	<i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay
<i>engl.</i>	Englisch
eqMZ	Equine Müllerzellen
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
Fig.	Abbildung (<i>engl.</i> Figure)
FoxP3	<i>engl.</i> forkhead box protein P3
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>engl.</i> γ -aminobutyric acid)
GCL	Ganglienzellschicht (<i>engl.</i> ganglion cell layer)
GDNF	<i>engl.</i> glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP	<i>engl.</i> glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>engl.</i> Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)

Abkürzungsverzeichnis

GS	Glutamin-Synthetase
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	<i>engl.</i> human leukocyte antigen
ICAM-1	<i>engl.</i> intercellular adhesion molecule 1
ICOS	<i>engl.</i> inducible T-cell costimulator
ICOSLG	<i>engl.</i> inducible T-cell costimulator ligand
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
ILM	Innere limitierende Membran
INL	Innere Körnerschicht (<i>engl.</i> inner nuclear layer)
IPL	Innere plexiforme Schicht (<i>engl.</i> inner plexiform layer)
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
JAM2	<i>engl.</i> junctional adhesion molecule 2
K ⁺	Kalium
Kir	Einwärts gleichrichtender Kalium-Kanal (<i>engl.</i> inwardly rectifying K ⁺ channel)
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> liquid chromatography)
LFA-1	<i>engl.</i> lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MAH	Maackia Amurensis Hämagglutinin
MAL	Maackia Amurensis Leukoagglutinin
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>engl.</i> matrix assisted laser desorption/ionization)
MCP-1	<i>engl.</i> monocyte chemoattractant protein-1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> major histocompatibility complex)
MIO-M1	<i>engl.</i> Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1
MIP-1 α	<i>engl.</i> macrophage inflammatory protein 1 α
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> messenger ribonucleic acid)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mV	Millivolt
N. opticus	Nervus opticus

Abkürzungsverzeichnis

NEU1	Neuraminidase 1
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolyneuraminsäure
NFκB	<i>engl.</i> nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF	<i>engl.</i> nerve growth factor
NH ₃	Ammoniak
NH ₄	Ammonium
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
OLM	Äußere limitierende Membran (<i>engl.</i> outer limiting membrane)
ONL	Äußere Körnerschicht (<i>engl.</i> outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (<i>engl.</i> outer plexiform layer)
PD-L1	<i>engl.</i> programmed death-ligand 1
PD-L2	<i>engl.</i> programmed death-ligand 2
PEDF	<i>engl.</i> pigment epithelium derived factor
RANTES	<i>engl.</i> regulated and normal T cell expressed and secreted
RGC-5	<i>engl.</i> retinal ganglion cell 5
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> ribonucleic acid)
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT-PCR	<i>engl.</i> real-time polymerase chain reaction
S-Ag	S-Antigen
SAMPs	<i>engl.</i> self-associated molecular patterns
SF	Synoviale Fibroblasten
siRNA	<i>engl.</i> small interfering RNA
SLIP	<i>engl.</i> sympathetic loss of immune privilege
SNA	Sambucus Nigra Lektin
Suppl.	<i>engl.</i> supplementary
Tab.	<i>engl.</i> table
TGF-β	<i>engl.</i> transforming growth factor β
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIM-2	<i>engl.</i> T cell immunoglobulin-domain and mucin-domain 2
TLR	Toll-like Rezeptoren

Abkürzungsverzeichnis

TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TOF	<i>engl.</i> time-of-flight
TRAIL	<i>engl.</i> tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TSP-1	Thrombospondin-1
VCAM-1	<i>engl.</i> vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Endothelwachstumsfaktor (<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)
VIP	<i>engl.</i> vasoactive intestinal peptide
VNAR	<i>engl.</i> variable domain of the Novel Antigen Receptor
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Als Makrogliazellen der Retina üben Müllerzellen eine Vielfalt an essenziellen Funktionen aus, ohne die die Aufrechterhaltung des Visus nicht möglich wäre (Shen et al. 2012, Reichenbach und Bringmann 2020). Sie zeichnen sich vor den verschiedenen retinalen Zelltypen unter anderem dadurch aus, dass sie die gesamte Breite der Retina durchziehen und in Kontakt mit den retinalen Neuronen sowie mit dem Glaskörper und – im Falle einer vaskularisierten Retina – auch mit den retinalen Blutgefäßen in Verbindungen stehen (Newman und Reichenbach 1996). Dadurch sind sie in der Lage, an der Aufrechterhaltung der retinalen Ionen-, Wasser- und pH-Homöostase mitzuwirken, sowie die retinalen Neuronen unter anderem durch das Recyclen von Neurotransmittern und die Sekretion neurotropher Faktoren zu unterstützen (Reichenbach und Bringmann 2020). Eine besondere Rolle kommt den Müllerzellen auch im Rahmen der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) zu (Hauck et al. 2007, Eberhardt et al. 2011, Deeg et al. 2016). Hierbei handelt es sich um eine chronisch rezidivierende autoimmune Entzündung des Auges, bei der autoreaktive T-Zellen die Blut-Retina-Schranke (BRS) überwinden und retinale Autoantigene angreifen (Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2002b, Kleinwort et al. 2016, Wiedemann et al. 2020). Dies führt zur fortschreitenden Schädigung der intraokulären Strukturen und somit häufig zur Erblindung des betroffenen Auges (Deeg et al. 2002a, McMullen und Fischer 2017). Aufgrund der hohen Prävalenz in der Pferdepopulation sowie den gravierenden Folgen der Erkrankung ist die ERU von großer veterinärmedizinischer Relevanz (Gerding und Gilger 2016, Degroote und Deeg 2020). Zudem stellt sie das einzige spontane Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis dar (Deeg et al. 2002b, Deeg et al. 2007c, Barfüßer et al. 2021). Die Ätiologie und Pathogenese der ERU sind bis zum heutigen Tag nicht vollständig geklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Erkrankung zur Gliose von Müllerzellen kommt (Hauck et al. 2007, Eberhardt et al. 2011). Nahezu jede Pathologie der Retina ist gekennzeichnet durch eine Gliose der Müllerzellen, was neben der anfänglich neuroprotektiven Wirkung im fortschreitenden Krankheitsverlauf zunehmend zu Funktionsverlust führt (Bringmann et al. 2009a, Vecino et al. 2016). Im Verlauf der ERU konnte neben den verschiedenen gliotischen Veränderungen auch die Expression von Interferon (IFN)- γ in Müllerzellen nachgewiesen werden (Hauck et al. 2007, Eberhardt et al.

2011, Deeg et al. 2016). Auch in verschiedenen anderen *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen wurde eine immunologische Funktion von Müllerzellen beobachtet, unter anderem die Expression von Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder MHC-Klasse-II-Molekülen und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Roberge et al. 1988, Kumar und Shamsuddin 2012, Natoli et al. 2017, Heng et al. 2019, Rezzola et al. 2021). Es ist jedoch unzureichend geklärt, inwiefern die Müllerzellen an der retinalen Immunantwort beteiligt sind und welche Folgen ihre Aktivierung im Rahmen der ERU hat. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Reaktion von Müllerzellen auf ein inflammatorisches Milieu näher zu charakterisieren und ihre Beteiligung am uveitischen Geschehen weiter zu untersuchen, um so einen Einblick zu erhalten in ihre Beteiligung an der retinalen Inflammation und an der Pathogenese der ERU.

2 LITERATUR

2.1 Müllerzellen der Retina

2.1.1 Morphologie

Im Jahr 1851 beschrieb der Würzburger Anatom Heinrich Müller in seinen Ausführungen über die Histologie der Netzhaut Radialfasern mit seitlichen Fortsätzen, die in enger Verbindung mit anderen Zellen der Retina stehen (Müller 1851). Diese Zellen, nach ihm als Müllerzellen benannt, bilden zusammen mit den Astrozyten die Makrogliazellen der Retina (Reichenbach und Bringmann 2020). Im Gegensatz zu den Astrozyten, die vorwiegend in der Nervenfasern- und Ganglienzellschicht lokalisiert und nur in vaskularisierten Netzhäuten zu finden sind, durchziehen Müllerzellen die Retina in ihrer ganzen Breite und stellen in avaskulären Netzhäuten wie der des Pferdes die einzigen Makrogliazellen dar (Schnitzer 1988, Newman und Reichenbach 1996). Ausgehend von ihren Zellkernen in der inneren Körnerschicht erstreckt sich ihr Zellstamm sowohl Richtung Glaskörper als auch in Richtung des retinalen Pigmentepithels (RPE) (Newman und Reichenbach 1996). An der inneren limitierenden Membran (ILM), die die Retina vom Glaskörper abgrenzt, sind die Stammfortsätze der Müllerzellen trichterförmig zu sogenannten Endfüßen verbreitert, während ihre Ausläufer in der äußeren Körnerschicht die Zellkerne der Photorezeptoren ummanteln und zur äußeren limitierenden Membran (*engl.* outer limiting membrane, OLM) beitragen (Newman und Reichenbach 1996). Von ihrem Zellstamm ausgehend erstrecken sich seitliche Fortsätze in die plexiformen und nukleären Schichten der Retina, wo sie sowohl die Synapsen, als auch die Somata neuronaler Zellen umhüllen (Newman und Reichenbach 1996, Reichenbach und Bringmann 2020). Mit ihren Fortsätzen umgeben sie auch retinale Kapillaren und tragen so zur inneren BRS bei (Tout et al. 1993). Müllerzellen nehmen somit eine einzigartige Position in der retinalen Architektur ein, da sie sowohl mit allen anderen Zellen der Retina in Verbindung stehen als auch mit den extraretinalen Kompartimenten, also dem Glaskörper und dem subretinalen Raum sowie den retinalen Blutgefäßen (Bringmann et al. 2006). Jede Müllerzelle bildet dabei das Kernstück der kleinsten funktionellen Einheit in der Retina, die aus jeweils einer Müllerzelle und einer je nach Spezies unterschiedlichen Anzahl an Photorezeptoren und inneren retinalen

Neuronen besteht (Reichenbach und Robinson 1995, Reichenbach und Bringmann 2013).

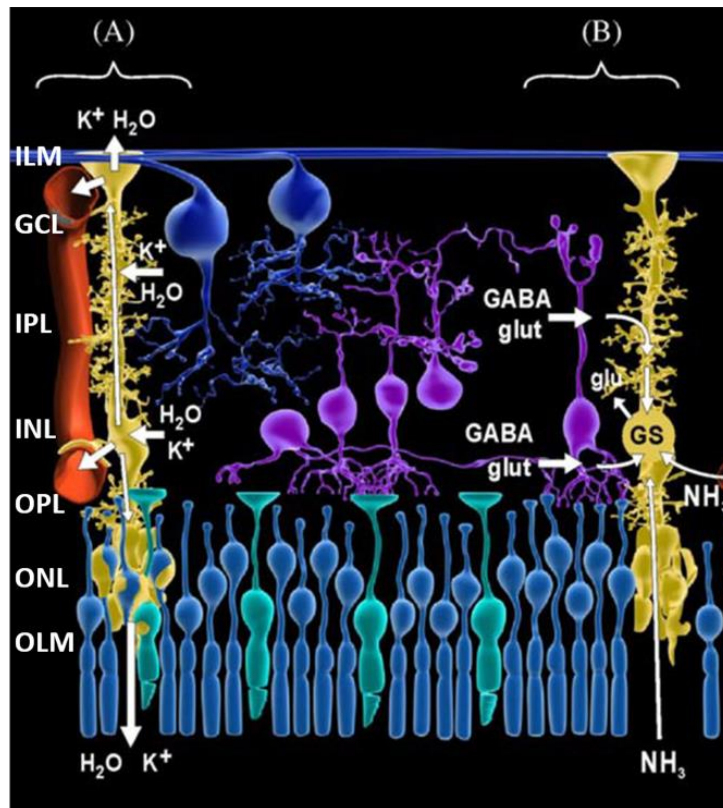


Abb. 1. Aufbau der Retina und Morphologie sowie Funktionen der Müllerzellen (gelb). Von den Zellkernen in der inneren Körnerschicht (*engl.* inner nuclear layer, INL) ziehen die Stammfortsätze Richtung Glaskörper und subretinalen Raum. An der inneren limitierenden Membran (*engl.* inner limiting membrane, ILM), die an den Glaskörper grenzt, endet die Müllerzelle in einem verbreiterten Endfuß. In der äußeren Körnerschicht (*engl.* outer nuclear layer, ONL) umgeben die Ausläufer der Müllerzellen die Zellkerne der Photorezeptoren (blau bzw. türkis) und bilden somit die äußere limitierende Membran (*engl.* outer limiting membrane, OLM). Von ihren Zellstämmen zweigen in den plexiformen Schichten (*engl.* inner and outer nuclear layer, IPL und OPL) Seitenäste ab, die in Verbindung stehen mit den in der Ganglienzellschicht (*engl.* ganglion cell layer, GCL) lokalisierten Ganglienzellen (dunkelblau) sowie mit Horizontal-, Bipolar- und amakrinen Zellen (violett) und Blutgefäßen (rot). Die Funktionen der Müllerzellen umfassen unter anderem das K⁺-Siphoning (A) und das Neurotransmitter-Recycling (B).

GABA, γ -Aminobuttersäure (*engl.* γ -aminobutyric acid); *glu* Glutamin; *glut*, Glutamat; GS, Glutamin-Synthetase; H₂O, Wasser; K⁺, Kalium-Ionen; NH₃, Ammoniak

Abb. modifiziert mit Genehmigung von Elsevier. Quelle: (Bringmann et al. 2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 25:397-424. Copyright Elsevier.

2.1.2 Physiologische Eigenschaften und Funktionen

2.1.2.1 Ionen-, Wasser- und pH-Homöostase

Aufgrund einer Vielzahl an Kalium (K^+)-Kanälen ist die Membran von Müllerzellen in hohem Maße permeabel für K^+ -Ionen (Newman 1985, Newman 1993). Vor allem der schwach einwärts-gleichrichtende K^+ -Kanal Kir4.1 ist wichtig für das Aufrechterhalten des sehr negativen Ruhemembranpotenzials von etwa -80mV und somit für die vielfältigen homöostatischen Funktionen der Müllerzelle (Kofuji et al. 2000). Dieser Kanal wird vor allem in denjenigen Regionen der Müllerzelle exprimiert, durch die K^+ -Ionen aus der Zelle ausgeschleust werden können, also perivaskulär sowie in den Endfüßen, die an den Glaskörper grenzen, und in geringerem Maße auch in den Zellausläufern an der äußeren limitierenden Membran (Kofuji et al. 2002). Im Gegensatz dazu ist der stark einwärts-gleichrichtende K^+ -Kanal Kir2.1 vorwiegend in Membrandomänen mit Kontakt zu retinalen Neuronen lokalisiert, also in den Stammfortsätzen sowie den davon abzweigenden seitlichen Ästen der Zelle (Kofuji et al. 2002). Kommt es durch die Aktivität der Neuronen zu einem Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration (Steinberg et al. 1980), werden die überschüssigen K^+ -Ionen mithilfe von Kir2.1-Kanälen aus dem Extrazellulärraum in die Müllerzelle aufgenommen und anschließend, vermittelt durch Kir4.1-Kanäle, in den Glaskörper, den subretinalen Raum oder retinale Gefäße ausgeschleust. Dieser als „ K^+ -siphoning“ bezeichnete Vorgang gleicht somit Schwankungen der extrazellulären K^+ -Konzentration aus (Newman et al. 1984, Karwoski et al. 1989, Reichenbach et al. 1992, Bringmann et al. 2006). In der avaskulären equinen Retina wurde dementsprechend eine gleichmäßige Verteilung von Kir4.1-Kanälen entlang der Müllerzelle festgestellt, was auf einen anderen Mechanismus für die Verteilung der K^+ -Ionen hinweist, beispielsweise das im Zentralen Nervensystem (ZNS) beschriebene K^+ spatial buffering (Eberhardt et al. 2011).

Im retinalen Gewebe akkumuliertes Wasser wird – osmotisch an die K^+ -Ströme gekoppelt – ebenfalls aus der Retina in die Blutbahn transportiert (Nagelhus et al. 1999, Bringmann et al. 2004). Vermittelt wird dieser Vorgang durch den wasserleitenden Kanal Aquaporin 4 (AQP4), der ebenso wie der K^+ -Kanal Kir4.1 in den Endfüßen sowie perivaskulär lokalisiert ist (Nagelhus et al. 1999, Katoozi et al. 2020). Dies legt den Schluss nahe, dass zusammen mit den K^+ -Ionen auch

überschüssiges Wasser von den Müllerzellen aus der Retina in Blutgefäße oder in den Glaskörper transportiert wird (Nagelhus et al. 1999). Eine Expression von AQP4 konnte weiterhin in perisynaptischen Membranen der Müllerzellen in den plexiformen Schichten gezeigt werden und dient der Versorgung der retinalen Nervenzellen mit Wasser (Nagelhus et al. 1999, Reichenbach und Bringmann 2020). AQP4-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren verminderte B-Wellen im Elektoretinogramm, was bestätigt, dass die AQP4-Expression in Müllerzellen zur Erhaltung einer normalen neuronalen Aktivität in der Retina beiträgt (Li et al. 2002). Neben der Ionen- und Wasser-Homöostase regulieren Müllerzellen zudem den retinalen pH-Wert, indem sie von Neuronen produziertes Kohlendioxid aufnehmen und mithilfe der Carboanhydrase zu Bicarbonat umwandeln, das sie dann in den Glaskörper und in retinale Gefäße abgeben (Newman 1994, Reichenbach und Bringmann 2013). Darüber hinaus tragen Müllerzellen durch ihre Zellfortsätze sowie durch die Sekretion antiangiogenetischer Faktoren wie PEDF (*engl.* pigment epithelium derived factor) und Thrombospondin-1 (TSP-1) zur Undurchlässigkeit der BRS bei (Eichler et al. 2004, Yafai et al. 2014). Die maßgebliche Rolle von Müllerzellen für die Aufrechterhaltung der Integrität der BRS wurde bei einer Studie mit transgenen Mäusen gezeigt, bei der die selektive Ablation der Müllerzellen zum Zusammenbruch der BRS mit Gefäßleckage und Neovaskularisation führte (Shen et al. 2012). Eine aktuelle Studie an murinen Netzhäuten stellte zudem fest, dass das Herunterregulieren von TIM-2, eines spezifischen Rezeptors für H-Ferritin, zum Zusammenbruch der BRS und in der Folge zu retinalen Ödemen führte (Valença et al. 2021).

Da neuronale Aktivität in der Retina zu einem Absinken der Osmolarität im Extrazellularraum führt (Dmitriev et al. 1999), verfügen Müllerzellen über Mechanismen, ihr eigenes Zellvolumen in Abhängigkeit der extrazellulären Osmolarität zu regulieren (Wurm et al. 2010). Dazu gehören neben der Expression von K⁺- und Wasserkanälen die Sekretion von Gliotransmittern wie ATP und Adenosin (Reichenbach und Bringmann 2013). Diese bewirken über die purinergen Rezeptoren der Müllerzellen autokrin die Öffnung von K⁺- und Cl⁻-Kanälen (Wurm et al. 2010). Der Ausstrom von K⁺- und Cl⁻-Ionen verhindert ein hypoosmotisches Schwellen der Müllerzellen trotz hypoosmolarem extrazellulärem Milieu (Wurm et al. 2010). In einer aktuelleren Studie wurde zudem herausgefunden, dass der von der extrazellulären Osmolarität abhängige Ausstrom der Aminosäuren Glutamat

und Taurin durch den Volumen-regulierten Anionen-Kanal eine maßgebliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zellvolumens bei Schwankungen der extrazellulären Osmolarität spielt, wobei nur der Ausstrom von Taurin großteils Ca^{2+} -abhängig war (Netti et al. 2018).

2.1.2.2 Energiemetabolismus

Die Stoffwechselverhältnisse in der Retina werden in der bestehenden Literatur kontrovers diskutiert (Toft-Kehler et al. 2018). Zunächst wurde angenommen, der Stoffwechsel von Müllerzellen basiere vorwiegend auf der Glykolyse, wobei bei anhaltendem Glukose-Mangel auch die mitochondriale Zellatmung zur Energiegewinnung herangezogen werden könne (Poitry-Yamate et al. 1995, Winkler et al. 2000). Eine Zellkultur-Studie an humanen Müllerzellen kam zu dem Ergebnis, dass es in Müllerzellen lediglich im Fall eines Glukose-Mangels bei gleichzeitiger Hemmung der Mitochondrien zur Störung der ATP-Synthese kommt (Winkler et al. 2000). Zudem wird angeführt, dass Müllerzellen weniger empfindlich gegenüber Sauerstoffmangel sind als die retinalen Neuronen, da sie auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung Glukose zu Laktat verstoffwechseln (Warburg-Effekt) und somit Sauerstoff für die Nervenzellen einsparen, die einen höheren Sauerstoffbedarf haben (Winkler et al. 2000, Ng et al. 2015, Toft-Kehler et al. 2018). Eine frühe Studie an isolierten Müllerzellen und Photorezeptoren von Meerschweinchen sowie Müllerzellen, die noch im Verbund mit Photorezeptoren waren, kam zu dem Ergebnis, dass das von den Müllerzellen produzierte Laktat zu den Neuronen transportiert wird (Poitry-Yamate et al. 1995). Aktuellere Studien zweifeln das Konzept der Laktatproduktion durch Müllerzellen jedoch an, da Untersuchungen an Mäuse-Netzhäuten ergaben, dass Müllerzellen kaum Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase exprimieren, Enzyme, die notwendig sind für die Produktion von Laktat aus Glucose (Lindsay et al. 2014, Rueda et al. 2016). Im Gegensatz dazu verfügen Photorezeptoren über eine wesentlich höhere Kapazität für sowohl anaerobe als auch aerobe Glykolyse (Lindsay et al. 2014, Rueda et al. 2016). Rueda et al. kamen anhand ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass Müllerzellen Glutamat mithilfe der Glutamat-Dehydrogenase zu α -Ketoglutarat umwandeln, das in den Zitratzyklus eingeschleust wird, wodurch es letztlich zur Produktion von GTP kommt, das zur Energiegewinnung der Müllerzellen verwendet

wird (Rueda et al. 2016). In einer aktuellen Studie an transgenen Mäusen konnte bestätigt werden, dass Müllerzellen die Schlüsselenzyme für die anaerobe Glykolyse fehlen und dass Laktat nicht wie angenommen von den Müllerzellen zu den Photorezeptoren transportiert wird (Shen et al. 2021). Zudem zeigte diese Studie auf, dass Müllerzellen stattdessen mithilfe des Enzyms Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus 3-Phosphoglycerat Serin produzieren und damit auf verschiedene Weise die Photorezeptoren metabolisch unterstützen (Shen et al. 2021). Darüber hinaus verfügen Müllerzellen über intrazelluläre Glykogen-Speicher (Kuwabara und Cogan 1961, Pérezleón et al. 2013), die unter anderem bei erhöhtem extrazellulärem K^+ -Spiegel durch das Enzym Glykogen-Phosphorylase hydrolysiert werden (Reichenbach et al. 1993, Pfeiffer-Guglielmi et al. 2005) und somit als Energie-Reserven dienen (Toft-Kehler et al. 2018).

2.1.2.3 Neurotransmitter-Recycling und Sekretion neurotropher Faktoren

Müllerzellen sind mit verschiedenen Transportern für Neurotransmitter ausgestattet und somit maßgeblich beteiligt an der Regulation der neuronalen Aktivität in der Retina (Reichenbach und Bringmann 2020). Mithilfe des spannungsabhängigen Glutamat-Aspartat-Transporters (GLAST) nehmen sie in den plexiformen Schichten extrazelluläres Glutamat auf und tragen so zur Erhaltung der visuellen Auflösung und der Regulation der synaptischen Signalübertragung bei (Higgs und Lukasiewicz 1999, Matsui et al. 1999, Rauen und Wiessner 2000, Bringmann et al. 2013). Dies ist essenziell für den Erhalt und die Funktion der Retina, da ein Überschuss an extrazellulärem Glutamat neurotoxisch wirkt (Izumi et al. 2002). Weiterhin verfügen Müllerzellen über Transporter für GABA (γ -Aminobuttersäure), das in die Zelle aufgenommen und zu Glutamat verstoffwechselt wird (Biedermann et al. 2002, Biedermann et al. 2004). Sowohl aus dem Extrazellularraum aufgenommenes als auch aus GABA verstoffwechseltes Glutamat wird in der Müllerzelle durch das Enzym Glutamin-Synthetase (GS) in Glutamin umgewandelt (Riepe und Norenburg 1977, Bringmann et al. 2009b). Dieses Glutamin wird den retinalen Neuronen als Vorstufe der Neurotransmitter Glutamat und GABA wieder zur Verfügung gestellt, ein Kreislauf, der als Glutamat-Glutamin-Zyklus bezeichnet wird (Pow und Crook 1996). Von den Neuronen stammendes Glutamat, GABA und Ammonium (NH_4^+) wird in Müllerzellen neben Glutamin auch zu Alanin und α -Ketoglutarat

verstoffwechselt (Poitry-Yamate et al. 1995, Poitry et al. 2000, Bringmann et al. 2009b). Diese Stoffwechselprodukte dienen den Neuronen bei metabolischem Stress als alternative Energiesubstrate (Poitry et al. 2000, Bringmann et al. 2009b). α -Ketoglutarat wird zudem von den Müllerzellen selbst als Substrat für den Zitratzyklus verwendet (Kalloniatis und Napper 2002, Ola et al. 2011, Rueda et al. 2016). Bei mangelhafter Glukose-Versorgung kann Glutamat somit als alternatives Energiesubstrat für die Zellatmung verwendet werden (Toft-Kehler et al. 2017). Gleichzeitig wird Glutamat von Müllerzellen zur Synthese anti-oxidativer Substrate wie Glutathion verwendet (Pow und Crook 1995, Reichelt et al. 1997), das bei oxidativem Stress von den Müllerzellen sezerniert und den Neuronen zur Verfügung gestellt wird (Schütte und Werner 1998). Die Neuroprotektivität von Müllerzellen äußert sich zudem in der Produktion neurotropher Faktoren, durch die sie zum Überleben und zur Regeneration von Neuronen beitragen (Bringmann et al. 2009a, von Toerne et al. 2014, Ruzafa et al. 2018, Eastlake et al. 2020, Zwanzig et al. 2021). Auf erhöhte Glutamatkonzentrationen reagieren Müllerzellen beispielsweise mit einer vermehrten Sekretion von BDNF (*engl.* brain-derived neurotrophic factor), NGF (*engl.* nerve growth factor) und GDNF (*engl.* glial cell-derived neurotrophic factor) (Taylor et al. 2003). Die Sekretion neurotropher Faktoren bewirkt auch nach der Transplantation von Müllerzellen in Tiermodellen von retinaler Degeneration das Überleben und die Regeneration von retinalen Neuronen (Eastlake et al. 2021). In einem Kokultur-Modell mit von embryonischen Stammzellen generierten murinen retinalen Ganglienzell-ähnlichen Zellen und humanen Müllerzellen konnte festgestellt werden, dass Müllerzellen durch die Sekretion neurotropher Faktoren zur Neuritogenese sowie zu verlängerter Lebensdauer der Ganglienzell-ähnlichen Zellen beitragen (Pereiro et al. 2020).

Zudem sezernieren Müllerzellen selbst Gliotransmitter wie Glutamat, ATP und Adenosin und beeinflussen dadurch die neuronale Aktivität (Reichenbach und Bringmann 2016). Die purinerge Signalübertragung zwischen Glia- und Nervenzellen ist beispielsweise involviert in die neurovaskuläre Kopplung, also die Regulation der lokalen Durchblutung in der Retina in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität (Metea und Newman 2006, Newman 2015).

2.1.2.4 Weitere Funktionen von Müllerzellen

Da die Retina ein invertiertes Organ darstellt, muss eindringendes Licht zunächst sämtliche Schichten der Retina durchqueren, bevor es zu den Photorezeptoren gelangt, wobei Müllerzellen als lichtleitende Fasern fungieren, die dafür sorgen, dass das Licht dabei möglichst wenig gestreut wird (Franze et al. 2007). Eine besondere Bedeutung kommt den Müllerzellen der Foveola, dem Ort des schärfsten Sehens, zu, da sie nicht die neuronale Aktivität unterstützen, sondern durch strukturelle Anpassungen eine verbesserte Lichttransmission ermöglichen (Bringmann et al. 2018, Reichenbach und Bringmann 2020).

Darüber hinaus sind Müllerzellen weicher als Neuronen und können so ihre Form an die Umgebung anpassen (Lu et al. 2006). Glutamat bewirkt in der Retina ein Schwellen der Neuronen (Uckermann et al. 2004), auf das Müllerzellen reagieren können, indem sie ihren inneren Stammfortsatz verlängern und somit verdünnen (Reichenbach und Bringmann 2013). Zudem könnte ihre Verformbarkeit eine wichtige Rolle spielen beim Wachstum von Neuriten, die von weichen Substraten geleitet werden müssen (Franze et al. 2009, Reichenbach und Bringmann 2013).

Müllerzellen halten demnach die retinale Homöostase und die Undurchlässigkeit der BRS aufrecht und unterstützen retinale Neuronen in vielfältiger Weise, indem sie ihnen Nährstoffe und Vorstufen von Neurotransmittern zur Verfügung stellen, deren „Abfallprodukte“ verstoffwechseln, neurotrophe Faktoren und Gliotransmitter sezernieren und mechanische Verformungen des retinalen Gewebes abpuffern sowie das Licht durch die Retina zu den Photorezeptoren leiten (Reichenbach und Bringmann 2013, Reichenbach und Bringmann 2020).

2.1.3 Müllerzell-Gliose

Nahezu jede pathologische Veränderung der Retina einschließlich altersbedingter Makuladegeneration, diabetischer Retinopathie oder Uveitis, führt zu reaktiver Gliose von Müllerzellen (Bringmann et al. 2006, Deeg et al. 2016, Li et al. 2021a, Rezzola et al. 2021). Gliose wird als Reaktion von Gliazellen auf Schäden des neuronalen Gewebes verstanden, mit dem Ziel, das Gewebe wiederherzustellen und vor weiterem Schaden zu schützen und somit die Gewebefunktion aufrechtzuerhalten (Liberto et al. 2004). Zu den unspezifischen Reaktionen, die unabhängig von der Art der Pathologie auftreten, gehören Zellhypertrophie,

Proliferation und eine vermehrte Expression der Intermediärfilamente GFAP (*engl.* glial fibrillary acidic protein), Vimentin und Nestin (Bringmann et al. 2009a). Dabei stellt die vermehrte GFAP-Expression den frühesten und sensitivsten Marker für aktivierte Müllerzellen dar (Bignami und Dahl 1979, Lewis und Fisher 2003). Gliose umfasst vor allem im frühen Stadium zunächst neuroprotektive Mechanismen, kann jedoch im weiteren Verlauf zur Neurodegeneration beitragen und die Regeneration des retinalen Gewebes behindern (Bringmann et al. 2009a, Vecino et al. 2016). Zu den protektiven Effekten der Müllerzell-Gliose gehören unter anderem die Produktion und Sekretion neurotropher Faktoren und Wachstumsfaktoren sowie antioxidativer Substanzen (Bringmann et al. 2009a, Vecino et al. 2016), die Aufnahme und Verstoffwechslung von überschüssigem neurotoxischem Glutamat (Schütte und Werner 1998, Bringmann et al. 2009b) und das Ausschleusen von K⁺-Ionen aus der Retina bei erhöhten extrazellulären K⁺-Spiegeln (Bringmann et al. 2006). Im Verlauf der Gliose kommt es zur verminderten Expression von Proteinen mit essenziellen Müllerzell-spezifischen Funktionen wie der Glutamin-Synthetase (Neurotransmitter-Recycling) und der Carboanhydrase (CO₂-Siphoning), was zu Störungen der retinalen Homöostase und der Interaktion zwischen Glia- und Nervenzellen führen kann (Eastlake et al. 2018). Zudem geht die Gliose häufig mit einem Rückgang der K⁺-Leitfähigkeit einher, sodass es zur Membrandepolarisation und somit zur weiteren Störung von Müllerzellfunktionen und retinaler Homöostase kommt (Ulbricht et al. 2008). Letztlich können diese gliotischen Veränderungen zur Entwicklung retinaler Ödeme und zu neuronalen Schäden durch Glutamat-Toxizität führen (Bringmann et al. 2009a). Weiterhin sezernieren gliotische Müllerzellen proinflammatorische und angiogenetische Proteine wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α (Hu et al. 2020), MCP-1 (*engl.* monocyte chemoattractant protein-1) und RANTES (*engl.* regulated and normal T cell expressed and secreted) (Eastlake et al. 2016) sowie VEGF (*engl.* vascular endothelial growth factor) (Le et al. 2021), was zu Schäden der BRS, zur Infiltration der Retina mit Entzündungszellen sowie zur Degeneration von Photorezeptoren führt (Nakazawa et al. 2007, Wang et al. 2015, Liu et al. 2021). Als Reaktion auf Schäden der Retina bilden Müllerzellen durch Hypertrophie, Proliferation und Migration eine sogenannte Glia-Narbe, mit der sie Lücken auffüllen, die durch die Degeneration verschiedener Zellen entstanden sind (Burke und Smith 1981, Dyer und Cepko 2000). Die vermehrte Expression von Intermediärfilamenten im Rahmen der Gliose führt dabei zu einer zunehmenden

Festigkeit in den unter physiologischen Bedingungen weichen und flexiblen Müllerzellen (Bignami und Dahl 1979, Bringmann und Wiedemann 2012). Dies trägt nicht nur zur Bildung der Glia-Narbe bei, sondern könnte auch verantwortlich sein für die fehlerhafte Wiederherstellung des retinalen Gewebes (Lu et al. 2011).

2.2 Immunologie des Auges

2.2.1 Immunprivileg des Auges

Der Begriff des Immunprivilegs wurde in den 1940er Jahren von Sir Peter Medawar geprägt, der festgestellt hatte, dass Hauttransplantate in der vorderen Augenkammer von Kaninchen überlebten, wohingegen sie in anderen Geweben wie beispielsweise der Haut abgestoßen wurden (Medawar 1948). Er folgerte, dass intraokuläre Alloantigene aufgrund des fehlenden lymphatischen Abflusses im Auge nicht in die abführenden Lymphknoten transportiert werden und somit keine Immunreaktion auslösen können (immunologische Ignoranz) (Medawar 1948). Heute ist bekannt, dass das Immunprivileg des Auges durch eine komplexe Kombination verschiedener anatomischer und physiologischer Elemente aufrechterhalten wird und dass Antigene aus dem Auge in sekundären lymphatischen Organen gefunden werden können (Camelo et al. 2006, Niederkorn 2021). Da sich die Retina als Teil des ZNS nach Verletzung oder Zerstörung nicht wieder regenerieren und der Verlust von neuronalen Zellen somit zur Erblindung führen kann (So und Aguayo 1985, Streilein 2003b), wird das Immunprivileg des Auges als evolutionäre Anpassung betrachtet, die die okulären Gewebe vor Funktionsverlust durch massive Entzündungsreaktionen schützt (Streilein 2003a). Dieser Schutz wird zum einen durch die BRS vermittelt, deren durch tight junctions eng verbundene Zellen dazu beitragen, das Auge vor äußeren Einflüssen zu schützen und ein eigenes Milieu aufrechtzuerhalten (Díaz-Coránguez et al. 2017, Fields et al. 2020). Zum anderen konnte anhand von Transplantations-Versuchen mit Ratten und Mäusen gezeigt werden, dass in der vorderen Augenkammer platziertes Antigen eine systemische Toleranz hervorruft (Kaplan et al. 1975, Kaplan und Streilein 1977, Streilein et al. 1980). Die Injektion von Mastzelltumorzellen (P815) in die vordere Augenkammer von BALB/c-Mäusen führte nicht nur zu unkontrolliertem Tumorwachstum im Auge, sondern auch dazu, dass subkutan

injizierte Tumorzellen ebenfalls wachsen konnten, im Gegensatz zu der Abstoßung, die bei lediglich subkutan mit P815-Zellen injizierten Mäusen erfolgte (Streilein et al. 1980). Diese systemische Abweichung des Immunsystems, die man in Ratten und Mäusen nachgewiesen hatte, bezeichnete man als „anterior chamber-associated immune deviation“ (Streilein und Niederkorn 1981). Dieselbe Reaktion konnte auch nach Injektion von Antigenen in den Glaskörper oder in den subretinalen Raum beobachtet werden (Wenkel et al. 1999, Sonoda et al. 2005). Charakteristisch für diese abweichende Immunantwort ist unter anderem die Unterdrückung einer Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion (*engl.* delayed type hypersensitivity, DTH) (Niederkorn und Streilein 1983). Dies kommt zustande, indem F4/80⁺ antigenpräsentierende Zellen das Auge über die Blutgefäße verlassen (Wilbanks et al. 1991, Lin et al. 2005) und zu den Marginalzonen der Milz wandern (Wilbanks und Streilein 1992), wo sie zelluläre Cluster mit Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), B-Zellen, und hohen Spiegeln an Interleukin (IL)-10, TGF- β (*engl.* transforming growth factor β) und TSP-1 bilden (Takeuchi et al. 1998, Sonoda et al. 1999, D'Orazio et al. 2001, Faunce et al. 2001, Sonoda et al. 2001). Schließlich werden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu den Zellclustern rekrutiert und zu antigenspezifischen T-Zellen mit regulatorischer Funktion geprägt (Wilbanks und Streilein 1990). Die regulatorische Funktion dieser Zellen wurde verantwortlich gemacht für die systemische Prävention der Transplantat-Abstoßung und der DTH (Jiang et al. 2009, Paunicka et al. 2012). ACAID ist eng an das anti-inflammatorische Milieu des Augeninneren gekoppelt, da okuläre antigenpräsentierende Zellen (APZ) durch anti-inflammatorische Faktoren wie TGF- β zur Induktion von regulatorischen T-Zellen befähigt werden (Wilbanks et al. 1992, Mir et al. 2015). Das anti-inflammatorische intraokuläre Milieu im Auge wird durch Faktoren wie TGF- β (Streilein und Cousins 1990), α -MSH (*engl.* alpha-melanocyte-stimulating hormone), Neuropeptid Y (Taylor et al. 1992, Benque et al. 2018) und VIP (*engl.* vasoactive intestinal peptide) (Taylor et al. 1994) aufrecht erhalten (Taylor und Ng 2018). Eine *in-vivo*-Studie an transgenen Mäusen konnte nachweisen, dass naive T-Zellen, die gegen retinale Antigene gerichtet sind, im Auge zu FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) geprägt werden (Zhou et al. 2012). Dies galt allerdings nicht bei bestehender Inflammation und auch nicht für bereits aktivierte T-Zellen (Zhou et al. 2012). Auch RPE-Zellen sezernieren TGF- β und hemmen so *in vitro* die Aktivierung von T-Zellen (Sugita et al. 2006). Neben den löslichen Faktoren führen auch Moleküle auf der Membran der Zellen, die das

Augeninnere auskleiden, zur Apoptose eindringender Immunzellen (Taylor und Ng 2018). Dazu gehören unter anderem Fas-Ligand (Ferguson und Griffith 2006), TRAIL (*engl.* tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) (Wang et al. 2003) und PD-L1 (*engl.* programmed death-ligand 1) (Sugita et al. 2009a, Sugita et al. 2009b). Trotz der vielfältigen Schutzmechanismen des Auges gibt es Szenarien, in denen das Immunprivileg nicht aufrechterhalten wird (Nieder Korn 2021). In einem Mäusemodell für Hornhauttransplantationen wurde gezeigt, dass die Verletzung cornealer Nerven durch die Freisetzung des Neuropeptids substance P dazu führt, dass residente CD11c⁺ dendritische Zellen (DZ) zu sogenannten Contrasuppressor Zellen transformiert werden (Paunicka et al. 2015). Diese Contrasuppressor Zellen sind in der Lage, die T_{regs} zu hemmen und führen somit zur Aufhebung des Immunprivilegs (*engl.* sympathetic loss of immune privilege, SLIP) (Paunicka et al. 2015, Neelam et al. 2018). Man geht davon aus, dass das Immunprivileg durch sogenannte „danger signals“ aufgehoben werden kann, um vor möglicherweise tödlichen Infektionskrankheiten zu schützen (Nieder Korn 2021). Substance P wird nach der Verletzung cornealer Nerven, aber auch durch Infektionserreger freigesetzt und stellt ein solches „danger signal“ dar, das zur Aufhebung des Immunprivilegs führen kann (Nieder Korn 2019).

2.2.2 Immunzellen der Retina

Unter physiologischen Bedingungen machen die dichten tight junctions der inneren und äußeren BRS die Retina unzugänglich für periphere Entzündungszellen aus dem Blut (Díaz-Coránguez et al. 2017, Fields et al. 2020). Die ansässigen Immunzellen des ZNS und somit der Retina sind die Mikrogliazellen, die sowohl in der Nervenfaserschicht, als auch in der inneren und äußeren plexiformen Schicht angesiedelt sind (Diaz-Araya et al. 1995). Diese Mikrogliazellen sind keine eigentlichen Gliazellen, sondern stammen von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Dottersack ab und sind Teil des mononukleären Phagozytosesystems (Ginhoux et al. 2010). Ihre beweglichen Zellprozesse, mit denen sie ihre Umgebung überwachen, verleihen ihnen eine verästelte Morphologie, wohingegen aktivierte Mikroglia eine amöboide Morphologie und einen migratorischen Phänotyp annehmen können (Lee et al. 2008). Ihre Morphologie und ihr Verhalten werden durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst, unter anderem durch die

Neurotransmitter Glutamat und GABA (Fontainhas et al. 2011). Zu ihren zahlreichen Aufgaben gehören die Erhaltung der Struktur und Funktion von Synapsen, die Regulation der Neurogenese, die Phagozytose von toten Zellen oder Pathogenen und die Immunüberwachung (Rathnasamy et al. 2019). Als residente Immunzellen des ZNS sind sie bei Entzündungsreaktionen im Auge beteiligt an der Komplementaktivierung (Luo et al. 2011, Shahulhameed et al. 2020), der Antigenpräsentation (Broderick et al. 2000) und der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Sivakumar et al. 2011, Rathnasamy et al. 2019). Somit spielen sie eine tragende Rolle bei entzündlichen Augenerkrankungen wie der autoimmunen Uveitis (Okunuki et al. 2019) oder der diabetischen Retinopathie (Kinuthia et al. 2020, Li et al. 2021b). Aktivierte Mikroglia stehen in engen Wechselwirkungen zu Makrogliazellen (Wang et al. 2014, Conedera et al. 2019, Di Pierdomenico et al. 2020) und können in Müllerzellen die Produktion und Sekretion neurotropher Faktoren, aber auch pro-inflammatorischer Zytokine hervorrufen, die dann wiederum die Aktivität der Mikroglia verstärken (Wang et al. 2011). Müllerzellen, die *in vitro* durch Mikroglia aktiviert wurden, verstärken zudem die Migration der aktivierten Mikrogliazellen und exprimieren vermehrt Adhäsionsproteine, was darauf hindeutet, dass aktivierte Mikroglia an Müllerzellen entlang migrieren (Wang et al. 2011). Desweiteren führt von aktivierten Mikrogliazellen sezerniertes IL-1 β zu vermehrter Chemokin-Expression in Müllerzellen und RPE-Zellen (Natoli et al. 2017). In einem Ratten-Modell für Retinadegeneration wurde gezeigt, dass neben Mikrogliazellen auch Müller- und RPE-Zellen Chemokine sezernieren, was mit dem vermehrten Verlust von Photorezeptoren und der Einwanderung von CD45⁺ Zellen einherging (Rutar et al. 2015). Obwohl Müllerzellen keine eigentlichen Zellen des Immunsystems, sondern Gliazellen sind, konnte ihre aktive Beteiligung an immunologischen Vorgängen in der Retina vielfach demonstriert werden: Zellen der humanen Müllerzelllinie MIO-M1 sezernierten nach Infektion mit *S. aureus* pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8, TNF- α , und IL-1 β als auch antimikrobielle Peptide und reaktive Sauerstoffverbindungen und es konnte gezeigt werden, dass sie die Bakterien phagozytieren und töten können (Shamsuddin und Kumar 2011, Singh et al. 2014). In murinen Müllerzellen und in MIO-M1-Zellen wurde die Expression von TLRs (Kumar und Shamsuddin 2012) nachgewiesen, wobei die Stimulation von MIO-M1-Zellen mit TLR-Agonisten zum einen die vermehrte Expression der TLRs, zum anderen die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

bewirkte (Kumar und Shamsuddin 2012). Die Koinkubation mit aktivierten Lymphozyten (Roberge et al. 1988), die *in-vitro*-Stimulation mit IFN- γ (Mano et al. 1991) sowie okuläre Pathologien wie Uveitis (Romeike et al. 1998) oder subretinale Fibrose (Kim et al. 1987) induzierten in Müllerzellen die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen. Die Aktivierung von Müllerzellen und die daraus resultierende Produktion pro-inflammatorischer Zytokine spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Pathologien der Retina wie der diabetischen Retinopathie (Tu et al. 2020) oder der autoimmunen Uveitis (Hauck et al. 2007).

Sowohl in muriner als auch in humaner Retina sind entlang der Blutgefäße zudem perivaskuläre Makrophagen lokalisiert, die an den retinalen Gefäßen entlangwandern (Mendes-Jorge et al. 2009). Im Gegensatz zu Mikrogliazellen exprimieren diese Makrophagen auch unter physiologischen Bedingungen Scavenger-Rezeptoren und können Proteine aus dem Blut aufnehmen (Mendes-Jorge et al. 2009). In einem murinen Modell für Retinopathie sowie in humaner gliotischer Retina konnte eine Ansammlung dieser Zellen rund um die Läsion gezeigt werden (Mendes-Jorge et al. 2009). In Netzhäuten von C57BL/6-Mäusen konnte zudem eine kleine Population an 33D1⁺ MHC-Klasse-II^{high} exprimierenden DZ an den peripheren Rändern der Retina sowie juxtapapillär gezeigt werden (Xu et al. 2007). In BALB/c-Mäusen, die resistent sind gegenüber der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU), waren deutlich mehr 33D1⁺ DZ im retinalen Gewebe lokalisiert, wobei diese weniger MHC-Klasse-II exprimierten (Xu et al. 2007). In den Netzhäuten von B10.RIII Mäusen, die deutlich empfänglicher sind für EAU als C57BL/6-Mäuse, wurden hingegen keine 33D1⁺ oder MHC-Klasse-II⁺ Zellen gefunden (Xu et al. 2007). Die Induktion von EAU führte in den C57BL/6- und B10.RIII-Mäusen zu einer steigenden Anzahl an DZ innerhalb der Retina (Xu et al. 2007). Bemerkenswert ist zudem, dass die DZ in den C57BL/6-Netzhäuten vorwiegend am Eintrittsort der Entzündungszellen lokalisiert waren, nämlich perivaskulär an den Venolen (Xu et al. 2007). Allerdings exprimierten die in dieser Studie beschriebenen DZ auch nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und TNF α keine kostimulatorischen Moleküle, weswegen die Autoren folgerten, dass diese Zellen als APZ lediglich T-Zellen, die bereits in Kontakt mit ihrem Antigen gekommen sind, reaktiveren können (Xu et al. 2007). In einer Studie an transgenen Mäusen wurde ebenfalls gezeigt, dass sowohl die Anzahl an DZ in der Retina als auch deren Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen nach Verletzung der Retina

anstieg (Lehmann et al. 2010). Anhand von single cell RNA sequencing der Netzhäute von Wildtyp- sowie AIRE (Autoimmun-Regulator)-defizienten Mäusen, die als ein Modell für Uveoretinitis gelten, konnte die Zusammensetzung der verschiedenen Immunzelltypen innerhalb der Retina gezeigt werden (Heng et al. 2019). Die Netzhäute von Wildtyp-Mäusen wiesen neben Mikroglia eine kleine Population an monozytären Zellen auf, enthielten aber ansonsten keinerlei Entzündungszellen. In den Netzhäuten von AIRE^{-/-}-Mäusen konnten neben zahlreichen eingewanderten Entzündungszellen auch residente Immunzellen identifiziert werden, bestehend aus den retinalen Mikroglia und Zellen der monozytären Reihe (Heng et al. 2019). Letztere konnten noch einmal unterteilt und näher definiert werden als Monozyten, Makrophagen und DZ, perivaskuläre Makrophagen sowie plasmazytoide DZ (Heng et al. 2019).

Welche Zellen innerhalb der Retina eine antigenpräsentierende Funktion übernehmen, ist folglich noch nicht abschließend geklärt. Während zahlreiche Studien die Immunzellen der Netzhaut im Rahmen von Nagermodellen untersuchen, ist die genaue Zusammensetzung der residenten Entzündungszellen in der equinen Retina sowie deren jeweilige Rolle bei der Pathogenese der ERU bis dato nicht exakt bekannt (PubMed-Recherche Stand August 2021).

2.3 Equine rezidivierende Uveitis

2.3.1 Definition und Vorkommen

Die ERU ist eine ein- oder beidseitig auftretende chronisch rezidivierende Erkrankung des Pferdeauges, die gekennzeichnet ist durch wiederkehrende akute Entzündungsschübe, gefolgt von symptomfreien Phasen (Degroote und Deeg 2020). Die Schwere der Entzündung nimmt dabei häufig mit jedem Schub zu, so dass die intraokuläre Entzündung zur Zerstörung der Retina und damit letztlich zur Erblindung führt (Gilger und Michau 2004, McMullen und Fischer 2017). Die Prävalenz variiert je nach geographischer Lage mit Angaben zwischen 2-25% in den USA (Gilger 2010) und etwa 8% in einer deutschen Studie (Spiess 2010). Da die ERU häufig zur Erblindung des betroffenen Auges oder sogar beider Augen führt und ein erheblicher Teil der an ERU erkrankten Pferde daher euthanasiert werden

muss, kommt dieser Erkrankung eine große Bedeutung in der Veterinärmedizin zu (Gerding und Gilger 2016).

2.3.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der ERU ist bis heute nicht abschließend geklärt, jedoch konnten in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese gewonnen werden (Degroote und Deeg 2020). Der autoimmune Charakter der Erkrankung äußert sich in einer fehlgeleiteten Immunantwort auf retinale Antigene wie Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP), zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP) und S-Antigen (S-Ag) (Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2006a, Deeg et al. 2006b). Die Immunisierung von Pferden mit IRBP löst eine der spontanen Erkrankung ähnliche Uveitis aus (Deeg et al. 2002b). Auch in den Endphasen der Erkrankung, also in einem Stadium, in dem die retinale Architektur weitgehend zerstört ist, bleiben die Autoantigene in der Retina erhalten (Deeg et al. 2007b), was eine Erklärung für die persistierenden Entzündungsschübe darstellen könnte. Man geht davon aus, dass inter- und intramolekulares Epitop-Spreading für den rezidivierenden Charakter der ERU verantwortlich sind (Deeg et al. 2006a, Deeg et al. 2006b). Dabei kommt es zur Kreuzreaktion autoreaktiver T-Lymphozyten, die zunächst gegen ein spezifisches Autoantigen gerichtet waren, aber im Rahmen der chronischen Entzündung ein anderes, ähnliches Epitop erkennen und somit einen neuen Entzündungsschub auslösen (Vanderlugt und Miller 1996). Initiiert und mediiert werden die Entzündungsschübe durch autoreaktive CD4⁺ T-Zellen, die die BRS überwinden und eine intraokuläre Entzündung auslösen (Gilger et al. 1999, Kleinwort et al. 2016, Wiedemann et al. 2020). T-Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden weisen deutliche Veränderungen ihres Proteoms auf, wobei vor allem bei Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und -adhäsion spielen, eine veränderte Expression festgestellt wurde (Degroote et al. 2014, Degroote et al. 2017). Auch während und nach eines durch IRBP induzierten Entzündungsschubs konnten Veränderungen des T-Zell-Proteoms festgestellt werden (Hauck et al. 2017). Zudem weisen periphere Blut-Leukozyten an ERU erkrankter Pferde *in vitro* sowohl einen veränderten Stoffwechsel als auch eine höhere Beweglichkeit und schnellere und zielgerichtete Migration auf als die Zellen gesunder Kontrolltiere (Wiedemann et

al. 2020). Neben dem adaptiven Immunsystem sind auch Zellen und Moleküle des angeborenen Immunsystems in das Krankheitsgeschehen involviert. Eine wichtige Rolle spielen hierbei unter anderem neutrophile Granulozyten (Fingerhut et al. 2019, Weigand et al. 2021), aber auch das Komplementsystem (Deeg et al. 2007a, Zipplies et al. 2010). Verschiedene Studien an Müllerzellen und Zellen des RPE zeigen überdies eine maßgebliche Beteiligung der okulären Strukturen und Zellen selbst am Krankheitsverlauf (Hauck et al. 2007, Deeg et al. 2011, Eberhardt et al. 2011, Uhl et al. 2014, Deeg et al. 2016).

2.3.3 Klinisches und pathohistologisches Bild

Während eines akuten Schubs mit vornehmlicher Beteiligung der vorderen Segmente der Uvea zeigen erkrankte Pferde Epiphora, Blepharospasmus, Miosis und Hyperämie der Konjunktiva (McMullen und Fischer 2017). Je nach Lokalisation der Entzündung (anterior oder posterior) kann es unter anderem zu cornealen Ödemen, Trübungen in der vorderen Augenkammer, Katarakten, Synechien, Glaskörpertrübung- und degeneration und schließlich zur Phtisis bulbi oder zur Netzhautablösung kommen (McMullen und Fischer 2017, Fischer et al. 2019). Vor allem Appaloosas erkranken häufig an einer chronischen Form der ERU, die durch eine geringgradige Immunantwort gekennzeichnet und für den Besitzer oft nicht erkennbar ist (Gerding und Gilger 2016, Rockwell et al. 2020). Dies kann dazu führen, dass die Erkrankung erst im späten Stadium erkannt wird, wenn es zur Kataraktbildung oder zur Erblindung des Auges kommt (Gerding und Gilger 2016, Rockwell et al. 2020). Die Diagnose wird anhand der oben geschilderten klinischen Befunde in Kombination mit einer Vorgeschichte bereits vorausgegangener Entzündungsschübe gestellt (Gilger und Michau 2004, McMullen und Fischer 2017). Das histologische Bild ist gekennzeichnet durch Infiltrate von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in Iris, Ziliarkörper und Retina (Kalsow und Dwyer 1998, Romeike et al. 1998, Gilger et al. 1999, Kleinwort et al. 2016). Vor allem im Iris-Stroma und in der Choroidea im Bereich der Ora serrata finden sich Lymphfollikel, die hauptsächlich aus T-Zellen und zu kleineren Anteilen aus B-Zellen bestehen (Kleinwort et al. 2016). Mit fortschreitendem Stadium kommt es zur Degeneration der Retina, beginnend bei den Außensegmenten der Photorezeptoren über die Desintegration der Ganglienzell- und der inneren

Körnerschicht bis hin zur völligen Zerstörung der retinalen Architektur mit massiven Entzündungszellinfiltraten (Deeg et al. 2002a).

2.3.4 Rolle der Müllerzellen

Im Gegensatz zu den neuronalen Zellen der Retina bleiben Müllerzellen auch im fortgeschrittenen Stadium der Uveitis erhalten, allerdings mit deutlichen gliotischen Veränderungen (Deeg et al. 2002a, Hauck et al. 2007, Eberhardt et al. 2011). In der weitgehend avaskulären Retina des Pferdes sind Müllerzellen bis auf eine kleine Zone um den Austritt des N. opticus, die Blutgefäße und Astrozyten aufweist, die einzigen Makrogliazellen und somit von herausragender Bedeutung sowohl für die Physiologie als auch die Pathologie der equinen Retina (Schnitzer 1988). Die gliotischen Veränderungen der Müllerzellen im Verlauf der ERU umfassen die vermehrte Expression der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP bei gleichzeitig verminderter Expression von GS (Hauck et al. 2007, Eberhardt et al. 2011, Deeg et al. 2016). Weiterhin kommt es im Krankheitsverlauf zu Veränderungen der Expressionsmuster der Kaliumkanäle Kir4.1 und Kir2.1, sowie der Aquaporine AQP4, AQP5 und AQP11 in den gliotischen Müllerzellen, was durch eine Störung der Kalium- und Wasserhomöostase zur Entstehung retinaler Ödeme im Rahmen von ERU führen könnte (Eberhardt et al. 2011, Deeg et al. 2016). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Müllerzellen in der entzündeten Retina in der Lage sind, einen pro-inflammatorischen Phänotyp anzunehmen und sowohl IFN- γ zu sezernieren (Hauck et al. 2007), als auch MHC-Klasse-II-Moleküle zu exprimieren (Romeike et al. 1998). Während Müllerzellen im physiologischen Zustand neuroprotektives Osteopontin exprimieren, konnte in uveitischen Müllerzellen kaum noch Osteopontin-Expression nachgewiesen werden, was auf einen Verlust der Neuroprotektivität hinweist (Deeg et al. 2011). Die exakte Rolle der Müllerzellen für die Pathogenese der ERU und inwiefern ihre Beteiligung am Krankheitsgeschehen neuroprotektiv oder schädigend ist, muss in weiteren Forschungsarbeiten geklärt werden.

2.4 Autoimmune Uveitis des Menschen und Tiermodelle

Die autoimmune Uveitis des Menschen ist eine nicht-infektiöse, rekurrende oder chronische Entzündung der uvealen Anteile des Auges, also der Iris, des Ziliarkörpers und der Choroidea (Caspi 2010). Unbehandelt führt sie zu Komplikationen wie dem Makulaödem, Glaukom, Katarakt und Netzhautablösung (Tomkins-Netzer et al. 2014, Dick et al. 2016). In einer US-amerikanischen Studie waren 19,2% der untersuchten Uveitis-Patienten von Einschränkungen des Sehvermögens betroffen (Tomkins-Netzer et al. 2014). Trotz einer niedrigen Prävalenz tragen Uveitiden daher weltweit zu 5-10% der Fälle von Sehverlust bei (Miserocchi et al. 2013). Je nach anatomischer Lokalisation kann unterschieden werden zwischen der anterioren (Iriditis/ Iridozyklitis), intermediären (Pars planitis) und posterioren (Chorioretinitis) Form sowie der Panuveitis, die alle Anteile der Uvea betrifft (Forrester 1991). Manche autoimmunen Uveitiden sind Teil einer systemischen Erkrankung wie der juvenilen idiopathischen Arthritis, Morbus Behçet oder des Vogt-Koyanagi-Harada-Syndroms (Gery und Caspi 2018). Die Ätiologie der autoimmunen Uveitis ist bis heute unklar, jedoch konnten mithilfe der EAU wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese gewonnen werden (Diedrichs-Möhning et al. 2018, Gery und Caspi 2018). Die EAU ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die durch Immunisierung mit retinalen Antigenen wie S-Ag und IRBP hervorgerufen wird (Caspi et al. 1988). Zunächst in Ratten etabliert, wurde das Modell später auch in Mäusen entwickelt (de Kozak et al. 1981, Gery et al. 1986, Caspi et al. 1988). Die Induktion von EAU kann durch die aktive Immunisierung erfolgen, bei der den Tieren uveitogene Peptid-Antigene wie S-Ag oder IRBP subkutan injiziert werden (Caspi 2003). Um eine Immunreaktion auszulösen, werden die Antigene dabei vorher in Freund's komplettem Adjuvans gelöst (Caspi 2003). Ebenso lässt sich durch den adoptiven Transfer aktivierter uveitogener T-Zellen ein Krankheitsbild induzieren, das der humanen autoimmunen Uveitis ähnelt (Caspi 2003). Dazu werden Spendertiere wie oben beschrieben immunisiert und deren Zellen aus den Lymphknoten isoliert. Die isolierten Zellen werden zusammen mit dem immunogenen Peptid kultiviert und anschließend auf die Empfänger-Tiere übertragen (Caspi 2003). Sowohl zwischen Ratten und Mäusen als auch zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies gibt es deutliche Unterschiede hinsichtlich der Empfänglichkeit für EAU und des klinischen Bildes (Caspi et al. 1988, Caspi et

al. 1992, Sun et al. 1997). Die intraokuläre Entzündung wird mediiert durch autoreaktive CD4⁺ T-Zellen, die retinale Antigene angreifen (Gery und Caspi 2018). Zur Entwicklung von reifen T-Lymphozyten gehört die negative Selektion im Thymus, bei der unreife T-Zellen, die körpereigene Proteine erkennen, eliminiert werden (zentrale Toleranz) (Brown und Rudensky 2021). Sowohl für IRBP als auch für S-Ag wurde eine Expression im Thymus beschrieben, wobei gezeigt wurde, dass eine hohe Expression mit Resistenz gegenüber EAU korreliert (Egwuagu et al. 1997). Zudem konnte in einer Studie mit AIRE-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass der Verlust der Expression von IRBP im Thymus zu autoimmuner Uveitis führt (DeVoss et al. 2006). Autoreaktive T-Lymphozyten, die im Thymus nicht eliminiert wurden, gelangen in die Blutbahn, wo sie auf ihr Antigen treffen können (EITanbouly und Noelle 2021). Im peripheren Blut von Patienten mit autoimmuner Uveitis konnten S-Ag-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (de Smet et al. 1998). Binden die T-Lymphozyten das entsprechende Autoantigen ohne den Einfluss kostimulatorischer Signale, kommt es zur Anergie (periphere Toleranz) (EITanbouly und Noelle 2021). Da retinale Antigene aufgrund der undurchlässigen BRS jedoch in der Peripherie nicht anzutreffen sind, kommt es zur Störung der peripheren Toleranz und es bleibt eine kleine Population autoreaktiver T-Lymphozyten im Blut, die durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert werden können (Chen et al. 2004, Gery und Caspi 2018). Nach aktuellem Wissensstand geschieht dies entweder nach einem okulären Trauma (Chu und Chan 2013) oder via molekulare Mimikry durch Pathogene oder harmlose Nahrungsbestandteile (Horai und Caspi 2019, Wildner und Diedrichs-Möhring 2020). In der Peripherie aktivierte autoreaktive CD4⁺ T-Zellen können die BRS überwinden und so ins Auge gelangen, wo ihnen durch APZ ihre spezifischen Antigene präsentiert werden (Prendergast et al. 1998, Xu et al. 2003, Thurau et al. 2004). Dies löst eine intraokuläre Entzündung aus, bei der weitere Entzündungszellen aus dem Blut rekrutiert werden (Caspi et al. 1993, Kerr et al. 2008). Sowohl im Nagermodell als auch bei der autoimmunen Uveitis des Menschen wurde gezeigt, dass die Pathogenese vorwiegend durch autoreaktive Th17-Zellen und die Aktivierung des IL-17/IL-23-Signalwegs geprägt ist (Amadi-Obi et al. 2007, Zhong et al. 2021). Zellen des Immunsystems, die an der Regulation der Entzündung beteiligt sind, umfassen FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen (Liu et al. 2020) sowie NKT-Zellen (Oh et al. 2011, Tajiri et al. 2021) und DZ (Chong et al. 2015, Klaska et al. 2017). Während die Entzündungsreaktion bei EAU meist in den ersten zwei bis

drei Wochen nach Immunisierung ihren Höhepunkt erreicht und sich anschließend spontan zurückbildet (Chen et al. 2013), ist das Risiko für Komplikationen beim Menschen vor allem bei chronisch rezidivierender Uveitis gegeben (Dick et al. 2016). In einer aktuellen Studie an Mäusen wurde daher ein Modell für die chronische autoimmune Uveitis etabliert (Fan et al. 2021). Neben chronischer Chorioretinitis mit Zerstörung der BRS und der retinalen Architektur konnte in diesem Modell sowohl in der Retina als auch in peripheren lymphatischen Organen erstmals eine Population an CD44^{high} IL-17⁺ CD4⁺ Th17-Gedächtniszellen gezeigt werden. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass diese Th17-Gedächtniszellen an der Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation beteiligt sein könnten (Fan et al. 2021).

In den letzten Jahren konnte zudem eine Verbindung zwischen autoimmuner Uveitis und dem Mikrobiom festgestellt werden (Horai und Caspi 2019, Fu et al. 2021). Studien an Mäusen mit EAU zeigten auf, dass keimfreie Mäuse einen wesentlich schwächeren Uveitis-Verlauf aufwiesen als die konventionell aufgezogenen Tiere (Heissigerova et al. 2016). Zudem wurde beschrieben, dass die orale Verabreichung von Breitspektrum-Antibiotika das klinische Bild der EAU deutlich milderte (Heissigerova et al. 2016, Nakamura et al. 2016). Durch Dysbiose hervorgerufene Mechanismen, die zur Pathogenese der Uveitis beitragen, umfassen unter anderem die Zerstörung der Blut-Darm-Schranke, antigene Mimikry und den Verlust der intestinalen Immun-Homöostase (Fu et al. 2021). Diese wird aufrechterhalten durch ein Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen Th17-Zellen und T_{regs}, was durch die kommensalen Bakterien des Darms beeinflusst wird (Omenetti und Pizarro 2015). Dysbiosen des Darm-Mikrobioms können somit dazu beitragen, dass sich das Gleichgewicht in Richtung der Th17-Zellen verschiebt (Omenetti und Pizarro 2015). Ein solches Ungleichgewicht, mit einer steigenden Anzahl an Th17-Zellen und verringerten Leveln an T_{regs}, wurde unter anderem bereits im Zusammenhang mit der humanen HLA-B27 assoziierten vorderen Uveitis festgestellt (Zhuang et al. 2017). Dysbiosen können zudem zu einer durchlässigen Blut-Darm-Schranke führen, sodass vermutet wird, dass Bakterien oder ihre Produkte, die aus dem Darm in die Peripherie und somit auch ins Auge gelangen, dort eine Entzündung auslösen könnten (Rosenbaum et al. 2016). In einer Studie an B10.RIII-Mäusen mit EAU wurde festgestellt, dass die Induktion von EAU mit

einer vermehrten Durchlässigkeit der Blut-Darm-Schranke einherging (Janowitz et al. 2019).

Obwohl durch die oben beschriebenen Nagermodelle wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden konnten, können diese Modelle die spontane Erkrankung beim Menschen nur begrenzt widerspiegeln und haben daher nur eine beschränkte Aussagekraft (Chen et al. 2013). Daher kommt der ERU als dem einzigen spontanen Tiermodell wesentliche Bedeutung zu (Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2002b, Weigand et al. 2021). Neben Ähnlichkeiten im klinischen und histologischen Bild machen die höhere Prävalenz in der Pferdepopulation und das dadurch verfügbare Probenmaterial ERU zu einem vielversprechenden spontanen Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis (Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2002b). Das retinale Antigen CRALBP wurde zunächst im Pferd nachgewiesen (Deeg et al. 2006b), bevor es als Autoantigen im Menschen bestätigt wurde (Deeg et al. 2007c), was die Bedeutung der ERU für die Erforschung der humanen Uveitis unterstreicht.

2.5 Differenzielle Proteomanalyse

Der Begriff „Proteom“ wurde in den 1990er Jahren geprägt als Gesamtheit aller vom Genom codierten Proteine (Wilkins et al. 1996). Das Proteom ist im Gegensatz zum Genom jedoch hochdynamisch, denn alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen sowie die Zusammenlagerung verschiedener Proteine zu Proteinkomplexen erhöhen die Vielfalt und Komplexität des Proteoms, die durch die kodierende DNA nicht abgebildet wird (Baralle und Giudice 2017, Bludau und Aebersold 2020). Gegenüber den etwa 20.000 protein-kodierenden Genen des menschlichen Genoms (Collins et al. 2004) gehen aktuelle Schätzungen von über einer Million Proteoformen aus (Aebersold et al. 2018), also unterschiedlichen Proteinen, die zwar das Produkt eines einzelnen gemeinsamen Gens sind, aber sich aufgrund von alternativem Spleißen oder posttranslationaler Modifikation dennoch unterscheiden (Smith und Kelleher 2013). Die Proteomik kann folglich wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich des Zustandes einer Zelle oder eines Gewebes liefern (Sagmeister et al. 2021, Weigand et al. 2021). Vor allem quantitative Proteom-Analysen können durch die vergleichende Messung von physiologischen und pathologischen Proben Abweichungen des Proteoms aufzeigen und somit zur

Entschlüsselung Pathogenese-assoziiierter Mechanismen (Weigand et al. 2020, Weigand et al. 2021) sowie zur Identifizierung von Biomarkern (Lorenzo et al. 2021, Xiao et al. 2021) beitragen. Mit der Massenspektrometrie als Hypothesengenerierendem Ansatz können unvoreingenommen und mit hoher Spezifität große Mengen an Daten generiert werden, was sie vor allem für Modelle, bei denen ein Mangel an spezifischen Antikörpern vorherrscht, zu einem wertvollen Analyse-Instrument macht (Kleinwort et al. 2019, Tesena et al. 2021, Tritten et al. 2021, Wang et al. 2021a).

Die Massenspektrometrie beruht dabei auf der Messung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) von Peptiden oder Proteinen (Aebersold und Mann 2003). Zunächst werden die Proteine oder Peptide der zu messenden Probe durch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) (Karas und Hillenkamp 1988) oder Elektrospray-Ionisation (Fenn et al. 1989) ionisiert. Anschließend misst ein Massenspektrometer das m/z der ionisierten Peptide, beispielsweise mithilfe einer Ionenfalle, eines Quadrupols oder sogenannter time-of-flight (TOF) Massenspektrometer (Aebersold und Mann 2003). Ein Detektor zeichnet schließlich die Anzahl der Ionen pro m/z -Wert auf, woraus das Massenspektrum resultiert (Aebersold und Mann 2003). Mithilfe von Proteinsequenzdatenbanken wie Mascot (Matrix Science, London, UK, <http://www.matrixscience.com/>) können die Proteine anschließend anhand ihrer Massenspektren identifiziert werden (Degroote et al. 2019). Eine noch detailliertere strukturelle Analyse ermöglicht die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), bei der von den bereits gemessenen Peptidionen einige ausgewählte Peptide durch Kollision nochmals in Peptidfragmentationen zerteilt und abermals gemessen werden (Domon und Aebersold 2006). Bei der Bottom-up-Proteomik werden Proteine durch sequenz-spezifische Enzyme wie Trypsin in einzelne Peptide gespalten, bevor sie durch Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt und dem Massenspektrometer zugeführt werden (LC-MS bzw. LC-MS/MS) (Bludau et al. 2021). Bei der quantitativen Proteomanalyse muss unterschieden werden zwischen Methoden, die von der Markierung stabiler Isotope in den Proben abhängig sind (Ong et al. 2002) und sogenannten label-freien Methoden, bei denen anhand der gemessenen Massenspektren der einzelnen Peptide die Abundanz der jeweiligen Proteine in der Probe ermittelt und anschließend anhand einer Software normalisiert wird (Hauck et al. 2010).

2.6 Bedeutung von Membranproteinen

Membranproteine sind definiert als Proteine, die mit Lipiddomänen von biologischen Membranen assoziiert sind, und umfassen knapp ein Drittel des menschlichen Proteoms (Krogh et al. 2001, Almén et al. 2009). Sie werden unterteilt in integrale bzw. intrinsische Membranproteine, die in der Lipiddoppelschicht verankert sind oder durch sie hindurch reichen (Transmembranproteine) und die peripheren bzw. extrinsischen Oberflächenproteine, die nur oberflächlich mehr oder weniger stark mit der Zellmembran verbunden sind (Almeida et al. 2017). Als Transport-, Rezeptor- und Adhäsionsmoleküle übernehmen sie wichtige Funktionen innerhalb der Zelle (Almén et al. 2009) und stellen daher den Hauptangriffspunkt für medikamentöse Intervention dar (Santos et al. 2017). Eine besondere Bedeutung haben Membranproteine auch in der Immunologie: Phagozyten exprimieren Rezeptoren, mit denen sie Pathogene erkennen (Xia et al. 2021), Leukozyten verfügen über Adhäsionsmoleküle, um aus dem Blut in Entzündungsherde einzuwandern (Michael und Parsons 2020) und die Aktivierung von Lymphozyten durch APZ erfolgt mithilfe von kostimulatorischen und MHC-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche, die mit den Rezeptoren der Lymphozyten interagieren (Chen und Flies 2013). Diese Beispiele machen deutlich, dass die Immunantwort wesentlich von der Funktion der Membranproteine abhängt.

2.6.1 Massenspektrometrische Untersuchung von Membranproteinen

Aus den oben genannten Gründen nimmt die Untersuchung des Membran- bzw. Zelloberflächenproteoms einen hohen Stellenwert bei der Erforschung immunologischer Zusammenhänge ein (Degroote et al. 2017, Soday et al. 2021). Die Extraktion von Membranproteinen aus der hydrophoben Lipiddoppelschicht stellt jedoch eine Herausforderung dar und erschwert ihre proteomische Analyse (Wu und Yates 2003). Um Proteine aus der Zellmembran zu lösen, können Detergenzien verwendet werden, allerdings sind diese in späteren Analyseschritten oft störend (Pauwels et al. 2021). Das bei der Bottom-up-Proteomik meist verwendete Trypsin ist zudem ungeeignet, um die hydrophoben Anteile der Membranproteine zu spalten, sodass die entstandenen Peptide zur Präzipitation neigen (Pauwels et al. 2021). Eine weitere Herausforderung ist die Glykosylierung von Oberflächenproteinen, die zur sterischen Hinderung der Proteasen führt und

somit die Fragmentierung der Proteine für die massenspektrometrische Analyse erschwert (Pauwels et al. 2021). Um diesen Herausforderungen zu begegnen, wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Membranproteine für die massenspektrometrische Analyse aus Zellen zu extrahieren und anzureichern (Pauwels et al. 2021). Als Beispiele seien die Biotinylierung von Membranproteinen (Kalxdorf et al. 2017) sowie die sogenannten Glycocapture-Ansätze genannt, die sich die Glykosylierung von Oberflächenproteinen zunutze machen (Graessel et al. 2015, Matta et al. 2019).

2.6.2 Bedeutung der Sialinsäuren

Sialinsäuren sind Derivate der Neuraminsäure und umfassen eine Gruppe von negativ geladenen Zuckern mit einem Gerüst aus 9 Kohlenstoff-Atomen (Varki 1992). Aufgrund der vielen verschiedenen Modifikationen umfasst die Familie der Sialinsäuren mehr als 50 Mitglieder (Angata und Varki 2002), wobei die meisten Säugetiere N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glycolyneuraminsäure (Neu5Gc), Menschen jedoch lediglich Neu5Ac synthetisieren (Irie et al. 1998, Muchmore et al. 1998). Als terminale Zuckerreste von Glykoproteinen und Glykolipiden sind sie ein wesentlicher Bestandteil der Glykokalyx (Angata und Varki 2002). Die als Sialylierung bezeichnete Übertragung einer Sialinsäure auf ein Glykoprotein oder -lipid wird durch Sialyltransferasen vermittelt (Harduin-Lepers et al. 2001), die Entfernung einer Sialinsäure bezeichnet man als Desialylierung und die entsprechenden Enzyme als Neuraminidasen oder Sialidasen (Miyagi und Yamaguchi 2012). Als Bestandteil der Glykokalyx haben Sialinsäuren vielfältige und wichtige Funktionen: Als sogenannte „self-associated molecular patterns“ (SAMPs) werden sie von bestimmten Rezeptoren des Immunsystems, den Siglecs, gebunden und dienen so der Erkennung körpereigener Zellen durch das Immunsystem und der Modulation von Immunantworten (Lübbers et al. 2018, Läubli und Varki 2020). Siglecs werden unter anderem von hämatopoetischen Zellen exprimiert und übermitteln nach der Bindung an Sialinsäure auf körpereigenen Zellen meist ein inhibitorisches Signal, sodass die periphere Toleranz aufrechterhalten wird (Läubli und Varki 2020). Entsprechend kann es bei Störungen der Sialoglycan-Siglec-Achse zum Zusammenbruch der peripheren Toleranz und somit zu autoimmunen Erkrankungen kommen (Mahajan und Pillai

2016, Varki 2017, Läubli und Varki 2020). Weiterhin hemmt die Bindung von Faktor H an Sialinsäuren die Aktivierung des Komplementsystems (Fearon 1978, Meri und Pangburn 1990). Als Bestandteil der Liganden für Selektine sind Sialinsäuren zudem maßgeblich an der Migration von Immunzellen beteiligt (Rosen et al. 1985, Moore et al. 1992). Desialylierung von Glykoproteinen und -lipiden wurde unter anderem in Zusammenhang gebracht mit der Aktivierung von TLRs (Amith et al. 2010), mit vermehrter Phagozytose-Aktivität von Mikrogliazellen (Allendorf et al. 2020b), mit der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Wang et al. 2016), sowie der Umwandlung von synovialen Fibroblasten in einen pro-inflammatorischen Phänotyp (Wang et al. 2021b). Die Aktivität und Regulation von Neuraminidasen und damit einhergehend der Sialylierungszustand von Zellen und Geweben stellt somit ein wichtiges Forschungsgebiet der Immunologie dar.

3 PUBLIKATION I

Titel

NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells

Autoren

Lea Lorenz, Barbara Amann, Sieglinde Hirmer, Roxane L. Degroote, Stefanie M. Hauck und Cornelia A. Deeg

Journal

Glycobiology

Status

Publiziert.

Glycobiology. 2021 Feb 23:cwab014.

doi: 10.1093/glycob/cwab014.

Volume 31, Issue 7, July 2021, Pages 873–883

<https://doi.org/10.1093/glycob/cwab014>

By permission of Oxford University Press.

Translational Glycobiology

NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells

Lea Lorenz^{1,2}, Barbara Amann², Sieglinde Hirmer²,
Roxane L Degroote², Stefanie M Hauck³ and Cornelia A Deeg^{1,2}

²Chair of Physiology, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, Martinsried 82152, Germany, and ³Research Unit Protein Science, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Munich 80939, Germany

*¹To whom correspondence should be addressed: Tel: +49-89-2180-2552; Fax: +49-89-2180-2554;
e-mail: Cornelia.Deeg@lmu.de

Received 7 August 2020; Revised 5 February 2021; Accepted 5 February 2021

Abstract

Desialylation of cell surface glycoproteins carried out by sialidases affects various immunological processes. However, the role of neuraminidase 1 (NEU1), one of the four mammalian sialidases, in inflammation and autoimmune disease is not completely unraveled to date. In this study, we analyzed the retinal expression of NEU1 in equine recurrent uveitis (ERU), a spontaneous animal model for autoimmune uveitis. Mass spectrometry revealed significantly higher abundance of NEU1 in retinal Müller glial cells (RMG) of ERU-diseased horses compared to healthy controls. Immunohistochemistry uncovered NEU1 expression along the whole Müller cell body in healthy and uveitic states and confirmed higher abundance in inflamed retina. Müller glial cells are the principal macroglial cells of the retina and play a crucial role in uveitis pathogenesis. To determine whether higher expression levels of NEU1 in uveitic RMG correlate with the desialylation of retinal cells, we performed lectin-binding assays with sialic acid-specific lectins. Through these experiments, we could demonstrate a profound loss of both α 2-3- and α 2-6-linked terminal sialic acids in uveitis. Hence, we hypothesize that the higher abundance of NEU1 in uveitic RMG plays an important role in the pathogenesis of uveitis by desialylation of retinal cells. As RMG become activated in the course of uveitis and actively promote inflammation, we propose that NEU1 might represent a novel activation marker for inflammatory RMG. Our data provide novel insights in the expression and implication of NEU1 in inflammation and autoimmune disease.

Key words: neuraminidase 1, retinal inflammation, retinal Müller glia, sialic acids, spontaneous autoimmune disease

Introduction

Modification of cell surface sialylation plays an important role in various immunological processes (Varki and Gagneux 2012; Läubli and Varki 2020). Desialylation of glycoproteins carried out by sialidases (also referred to as neuraminidases) impacts receptor activation, differentiation of immune cells and modulation of cell signaling and phagocytosis (Seyrantepe et al. 2010; Wang et al. 2016; Karmakar et al. 2019; Allendorf, Franssen, et al. 2020a; Allendorf, Puigdellívol, et al. 2020b).

Retinal Müller glial cells (RMG), the main macroglial cells of the retina, were described as cells actively participating in the inflammation by upregulating major histocompatibility complex II (MHC-II) molecules and secreting cytokines upon stimulation (Mano et al. 1991; Hauck et al. 2007; Bringmann et al. 2009; Rutar et al. 2015; Eastlake et al. 2016; Natoli et al. 2017; Capozzi et al. 2018). However, desialylation was not described in this context. RMG are considered accountable for maintaining the retinal ion-, water- and pH-homeostasis, providing neurons with nutrients and contributing

to the maintenance of the blood-retinal barrier (BRB) (Reichenbach and Bringmann 2020). Upon ocular inflammation, RMG transform into an activated gliotic state with upregulation of their intermediate filaments vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) and downregulation of cell-specific proteins like glutamine synthetase (GS), potassium channel Kir 4.1 and aquaporins 5 and 11 (Hauck et al. 2007; Bringmann et al. 2009; Eberhardt et al. 2011; Deeg et al. 2016).

As a severe intraocular inflammatory disease, uveitis is a major cause of visual impairment worldwide, eventually leading to blindness (Tsirouki et al. 2018). Equine recurrent uveitis (ERU) is the only spontaneous animal model for autoimmune uveitis (Wiedemann et al. 2020), and both diseases resemble each other in many aspects, such as clinical manifestations and immunopathology (Deeg et al. 2002). Besides, ERU has a high prevalence in the horse population (Malalana et al. 2015) and since affected retinas are readily available and can be collected and used immediately after enucleation, ERU represents an excellent animal model to study spontaneous disease pathogenesis (Deeg et al. 2008). Both in ERU and human autoimmune uveitis, autoreactive CD4⁺ T-cells target retinal proteins, causing severe destruction of the retina (Caspi 2010; Wiedemann et al. 2020). In a previous study, primary RMG of ERU-diseased horses were shown to promote ocular inflammation by upregulating pro-inflammatory cytokine interferon γ (IFN)- γ (Hauck et al. 2007). Thus, RMG are supposed to play a decisive role in the pathogenesis of ocular inflammation, but the precise effects of RMG gliosis on uveitis pathogenesis remain to be elucidated. To gain further insight in the pathomechanisms underlying autoimmune uveitis and the role of RMG in the course of this sight-threatening disease, we analyzed primary RMG of healthy and ERU-diseased horses with differential proteome analysis and found a significant higher abundance of neuraminidase 1 (NEU1) in uveitic RMG.

NEU1 is an enzyme that cleaves terminal sialic acids from cell surface glycoproteins (Bonten et al. 1996). Thus, we were interested in how NEU1 impacts the sialylation state of retinal cells in this spontaneous model of autoimmune uveitis. It was shown that NEU1 is able to promote inflammation by desialylation of cell surface glycoproteins on immune cells such as macrophages and microglia (Amith et al. 2010; Karmakar et al. 2019; Allendorf, Franssen, et al. 2020a). Hence, the goal of this study was to corroborate the hypothesis that the higher abundance of NEU1 in uveitic RMG plays a significant role in the pathogenesis of uveitis by desialylation of retinal cells.

Results

Mass spectrometry reveals higher abundance of NEU1 and cathepsin A in an autoimmune disease

In a quantitative differential proteome analysis of RMG of healthy and ERU-diseased horses, we identified 172 proteins that were at least 1.8-fold more abundant in ERU and 345 proteins with a fold change of 0.6 or less in uveitic retina compared to healthy controls (Supplementary Table S1). Among the differentially abundant proteins was NEU1, which was 4-fold more abundant in RMG in uveitic state (Table I). Furthermore, cathepsin A (CTSA), a protease that associates with neuraminidase and is necessary for its stability and activity (van der Spoel et al. 1998; Bonten et al. 2014), was more abundant in uveitic RMG (Table I). We will refer to this protein in the following as protective protein cathepsin A (PPCA). Since the expression of NEU1 and PPCA in RMG was not described to date, we were interested to verify and further characterize their expression in

RMG in general. Further, we wanted to investigate their implications in a spontaneous autoimmune disease model.

RMG express NEU1 and PPCA

NEU1 (Figure 1) and PPCA (Figure 2) expressions were first analyzed in the retinal tissue with immunohistochemistry of controls (Figures 1A and 2A, differential interference contrast image [DIC]) and ERU cases (Figures 1B and 2B). RMG marker vimentin indicated RMG localization and morphology, spanning the entire retina from the inner limiting membrane (ILM) to the outer limiting membrane (OLM) in both healthy (Figures 1C and 2C) and ERU-affected (Figures 1D and 2D) eyes. Expression pattern of vimentin in the control and uveitic sections resembled each other, indicating an early stage of disease and gliosis. Expression patterns of NEU1 displayed a RMG characteristic columnar shape in healthy (Figures 1E and 3A, left panel) and diseased (Figures 1F and 3A, right panel) retinas. However, in ERU, a stronger immunoreactivity for NEU1 became apparent (Figures 1F and 3A, right panel). Overlay images of vimentin and NEU1 confirmed respective Müller cell association of NEU1 (yellow) both in healthy (Figure 1G) and uveitic (Figure 1H) retinas. PPCA expression could be detected in the different layers of the retina in healthy (Figures 2E and 3C, left panel) and uveitic (Figures 2F and 3C, right panel) states. Expression pattern of PPCA in the ILM and ganglion cell layer (GCL) revealed localization in RMG endfeet and trunks with their cell processes, but expression was also observed in a more punctate pattern in the INL and especially in the outer plexiform layer (OPL). Furthermore, the OLM stained heavily for PPCA. In the uveitic state (Figures 2F and 3C, right panel), a slight increase of immunoreactivity became apparent with the expression of PPCA also in the inner plexiform layer (IPL). Colocalization of vimentin and PPCA (yellow) was detected primarily in the RMG endfeet and trunks in the ILM and GCL both in healthy (Figure 2G) and uveitic retinas (Figure 2H).

NEU1 is significantly more abundant in RMG of uveitis cases

To verify the higher abundance of NEU1 in uveitis, NEU1 expression in RMG was quantified in healthy and diseased specimens (Figure 3). Quantification confirmed a significantly ($***P \leq 0.001$) higher abundance of NEU1 (Figure 3B) in ERU cases (black column) compared to healthy controls (white column). By contrast, quantification of PPCA expression (Figure 3D) in the retina sections of healthy controls (white column) and uveitic cases with high expression levels of NEU1 (black column) revealed no significant difference ($P > 0.05$). As NEU1 efficiently cleaves sialic acid from glycoproteins (Bonten et al. 1996), we were next interested in whether the retinal cell surface sialylation was affected by the increased abundance of NEU1 in uveitic RMG.

Cell surface sialylation changes profoundly in uveitic retina

To substantiate changes in the cell surface sialylation in ERU, binding capacities of different lectins (Table II) in the retinal tissue of healthy (Figure 4A, DIC) and diseased (Figure 4B, DIC) horses were analyzed. DIC image revealed a slight thickening of the ILM concomitant with a thinner photoreceptor outer segment (POS) in uveitis (Figure 4B). Wheat germ agglutinin (WGA, binding to *N*-acetylglucosamine [GlcNAc] and to a lesser extent to sialic acid *N*-acetyl-neuraminic acid [Neu5Ac]) was used as a negative control and was strongly positive in the ILM and OLM and in the plexiform layers in healthy reti-

Table I. Differential expression of NEU1 and CTSA in healthy and ERU affected RMG

Protein name	Gene name	Accession number	Unique peptides	Ratio ERU/healthy
Neuraminidase 1	NEU1	ENSECAP00000016932	2	4.0
Cathepsin A	CTSA	ENSECAP00000003740	7	1.9

Table II. Preferred binding substrates of used lectins

Acronym	Lectin name	Preferred binding substrates	References
WGA	Wheat germ agglutinin	GlcNAc(β 1-4GlcNAc(β 1-4GlcNAc)), Neu5Ac, GalNAc	(Nagata and Burger 1974)
MAL	<i>Maackia amurensis</i> leucoagglutinin	Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, SO4-3-Gal β 1-4GlcNAc	(Geisler and Jarvis 2011)
MAH	<i>Maackia amurensis</i> hemagglutinin	Sia α 2-3Gal β 1-3(+/- Sia α 2-6)GalNAc, SO4-3-Gal β 1-3(+/- Sia α 2-6)Gal(NAc)	(Geisler and Jarvis 2011)
SNA	<i>Sambucus nigra</i> lectin	Sia α 2-6Gal(NAc)	(Shibuya et al. 1987)

nas (Figures 4C and 5A, left panel). ERU cases (Figures 4D and 5A, right panel) revealed a similar expression pattern without obvious change in binding capacity. *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL) binding was detected in the IPL and OPL and the OLM in the healthy state (Figures 4E and 5B, left panel), illustrating α 2-3-linked sialic acids in N-linked glycans. By contrast, in autoimmune disease, a decrease in α 2-3-linked sialic acids became apparent (Figures 4F and 5B, right panel) specifically in the IPL. *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH), specific for α 2-3-linked sialic acids in O-linked glycans, was positive in the ILM and OLM, the GCL and the plexiform layers in healthy retina (Figures 4G and 5C, left panel). In the uveitic state, α 2-3-linked sialic acids almost completely disappeared from the ILM, the GCL and the IPL (Figures 4H and 5C, right panel). *Sambucus nigra* lectin (SNA), binding specifically to α 2-6-linked sialic acids, showed strong immunoreactivity along the ILM and in retinal ganglion cells as well as in the nuclear layers in healthy retinas (Figures 4I and 5D, left panel). In the diseased state, a strong decrease of α 2-6-linked sialic acids became apparent especially in the ILM (Figures 4J and 5D, right panel).

Binding capacity of sialic acid-binding lectins significantly decreases in uveitis

While WGA binding (Figure 5A), which served as a negative control, revealed no significant difference between healthy retinas (white column) and ERU cases (black column), there was a clear difference in the sialic acid-binding lectins in the autoimmune disease. Binding capacities of specifically sialic acid-binding lectins MAL (Figure 5B), MAH (Figure 5C) and SNA (Figure 5D) were significantly (** $P \leq 0.01$ for MAL and MAH and * $P \leq 0.05$ for SNA) decreased in ERU (black column) compared to healthy controls (white column).

Discussion

In this study, we provide novel insights into the role of NEU1 in a spontaneous animal model for human autoimmune uveitis. We demonstrated that NEU1 is present in the equine retina in RMG (Table I, Figures 1 and 3) and also in retinal ganglion cells. Presence and activity of neuraminidase was reported in the chick retina (Dreyfus et al. 1976) and in bovine retinal rod outer segment membranes (Dreyfus et al. 1983). Here, we could show NEU1 expression in the equine retina throughout the whole Müller cell body from the ILM to the OLM (Figures 1E and F and 3A). Furthermore, mass

spectrometry confirmed NEU1 expression in RMG (Table I) and in addition revealed the expression of PPCA (Table I), which is necessary for the stability and enzymatic activity of NEU1 (van der Spoel et al. 1998; Bonten et al. 2014).

Since the implications of NEU1 on autoimmune uveitis are unknown to date, we further analyzed NEU1 expression levels in uveitic retina. We detected a significantly higher abundance of NEU1 in uveitic RMG (Figure 3B), whereas PPCA abundance in RMG did not significantly increase in the course of disease (Figure 3D). Cathepsins are present in different localizations in the eye. Expression of PPCA was shown in mouse or rat cornea, pupil, lens, retinal pigment epithelium and in the optic nerve (Im and Kazlauskas 2007). While cathepsins seem to play a homeostatic role in the healthy eye, they were associated with the degradation of proteins and promotion of inflammation in pathological conditions (Im and Kazlauskas 2007). In this study, we report evidence for PPCA expression in the RMG of the equine retina by mass spectrometric analysis (Table I) and immunohistochemical assays (Figures 2E and F and 3C). However, in uveitis, higher expression levels of NEU1 were not accompanied by a higher abundance of PPCA (Figure 3D). Since we performed immunohistochemistry to analyze the overall PPCA protein abundance in equine retina, we cannot draw conclusions regarding potential differences in the activity of this enzyme between healthy and uveitic conditions with this method. To date, investigations on the interactions between PPCA and NEU1 had been performed in vitro with SV40-transformed simian cells (COS1 cells) (van der Spoel et al. 1998), insect cells (Bonten and d'Azzo 2000) and baculovirus-expressed wild-type and mutagenized recombinant enzymes and synthetic peptides (Bonten et al. 2009), but not in equine retinal cells. Therefore, this issue merits further investigation in the future.

As we previously demonstrated a pivotal role for RMG in uveitis pathogenesis (Hauck et al. 2007; Eberhardt et al. 2011; Deeg et al. 2016), we hypothesize that higher NEU1 abundance in RMG in this spontaneous autoimmune disease might play an important role in disease pathogenesis. In earlier studies, we showed that RMG actively contribute to inflammation, as they express IFN- γ in the uveitic state (Hauck et al. 2007). This is in line with the inflammatory potential of NEU1 that was demonstrated for different immune cells. In human T-lymphocytes, NEU1 expression and enzymatic activity increased upon the stimulation of the cells. Inhibition of this activity resulted in a significant reduction of IFN- γ production (Nan et al. 2007). We therefore speculate that a higher abundance of NEU1 in RMG is associated with the enhanced inflammation in

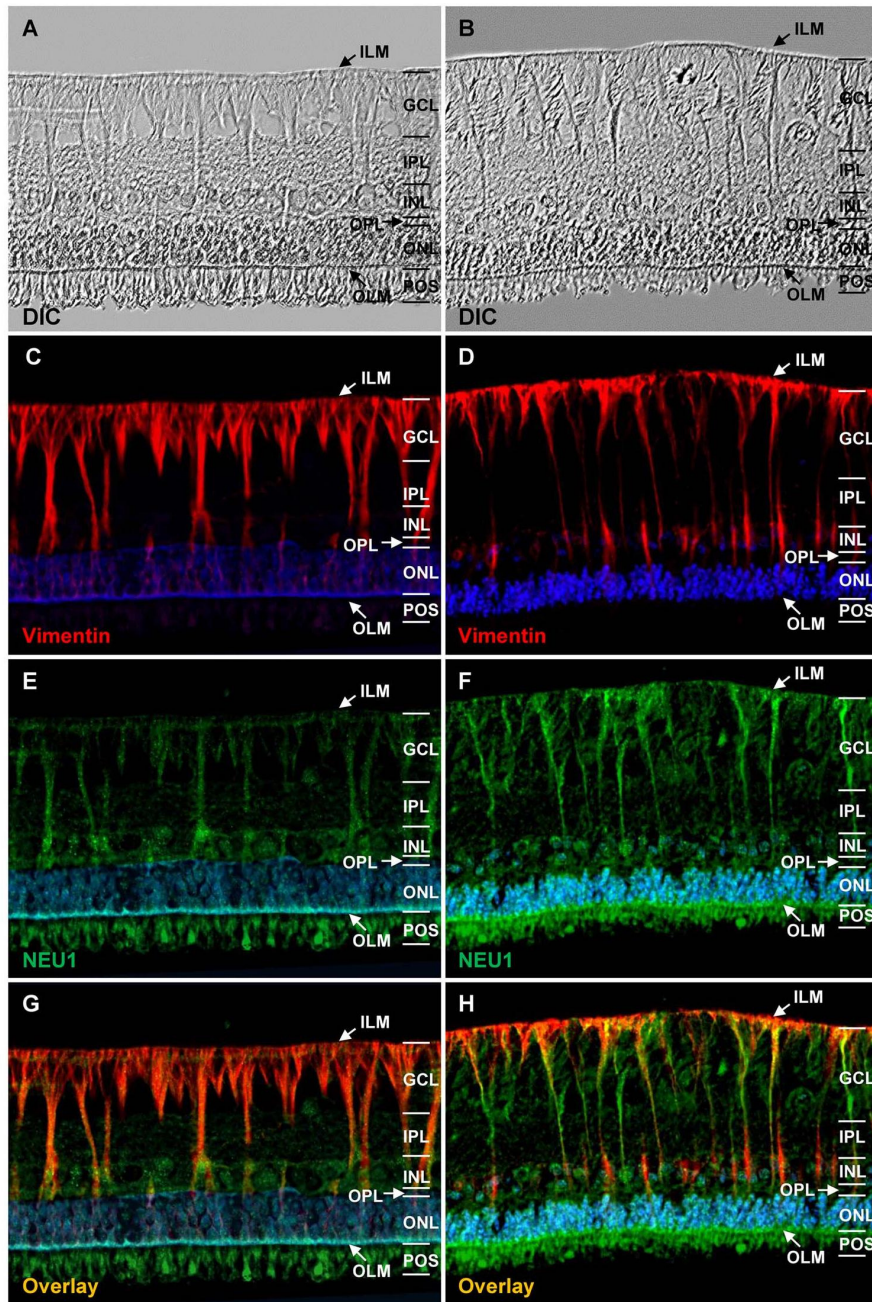


Fig. 1. RMG express NEU1 in healthy and uveitic state. DIC shows retinal structure in healthy (A) and uveitic (B) states. RMG marker vimentin (red) illustrated RMG localization and morphology within normal (C) and diseased (D) retinal tissue showing RMG characteristic columnar shape. Its expression pattern displayed only slight morphological changes of RMG in uveitic state (D), indicating the initial stage of gliosis. NEU1 expression pattern (green) revealed RMG morphology in both healthy (E) and diseased (F) state and higher abundance in uveitis (F). Double labeling (G, H) of vimentin (red) and NEU1 (green) confirmed NEU1 expression in RMG (colocalization yellow). $\times 400$ magnification. Cell nuclei were counterstained with DAPI in blue.

uveitis. Also, in the human monocytic cell line THP-1, differentiation into macrophages was associated with increased NEU1 activity and concomitant loss of cell surface sialic acids (Wang et al. 2016). Thus, our data indicate that NEU1 might represent a new activation marker for inflammatory RMG.

NEU1 catalyzes the removal of $\alpha 2$ -3- and $\alpha 2$ -6-linked sialic acids from cell surface glycoproteins (Bonten et al. 1996). Hence, we were interested in the sialylation state of retinal tissue in healthy and uveitic eyes. We could demonstrate a significant loss of terminal $\alpha 2$ -3- and $\alpha 2$ -6-linked sialic acids in uveitis (Figures 4

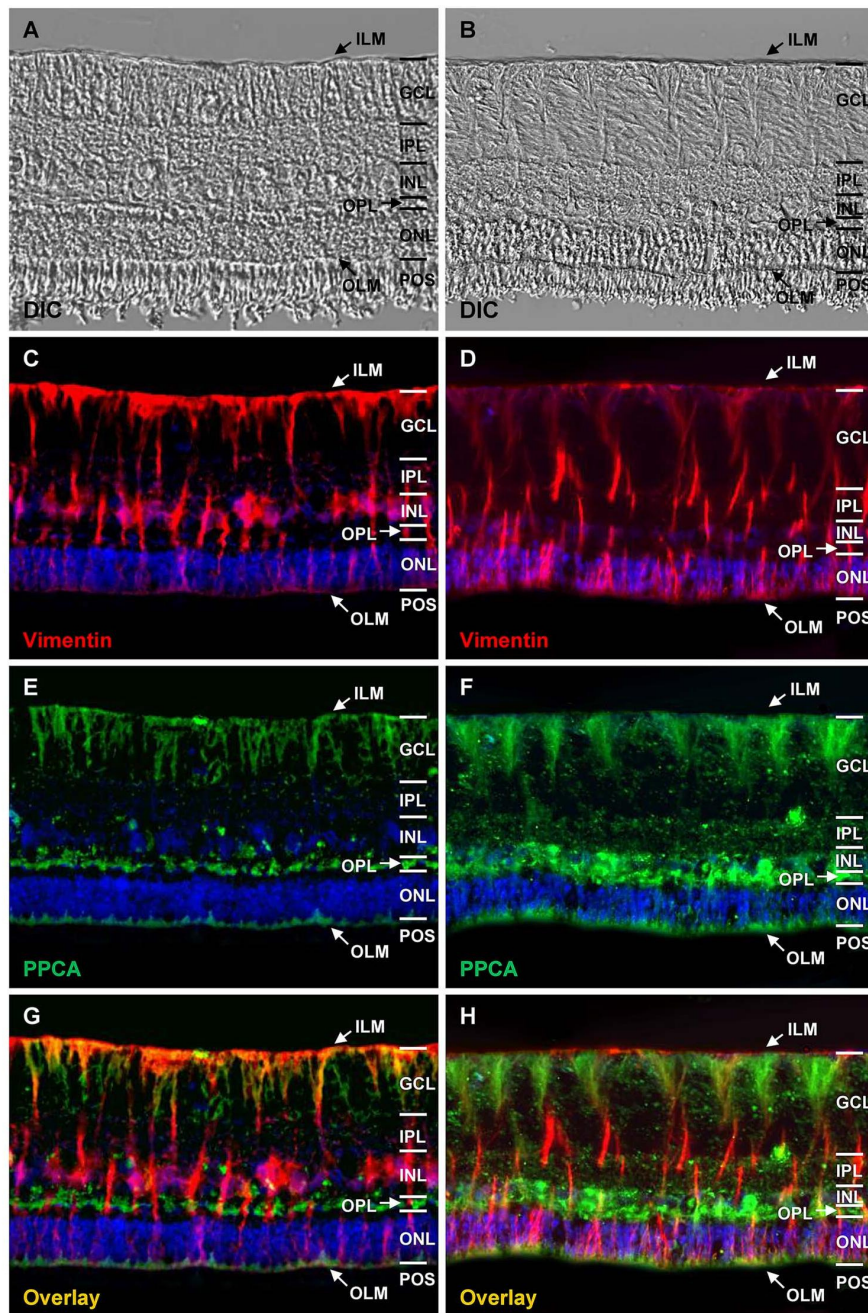


Fig. 2. PPCA is expressed in RMG in healthy and uveitic retina. DIC of representative healthy (A) and uveitic (B) retina sections reveals retinal architecture. Columnar expression pattern of intermediate filament vimentin (red) indicated RMG localization and morphology within healthy (C) and diseased (D) retinal tissue with signs of gliosis in uveitic state (D). PPCA expression (green) was detected especially in the GCL showing RMG characteristic shape and in the OPL and the OLM both in healthy (E) and diseased (F) retina. In uveitis (F), punctate expression increased especially in the IPL and INL. Overlay images of vimentin and PPCA demonstrate PPCA expression in RMG within healthy (G) and uveitic (H) retina (colocalization yellow). $\times 200$ magnification. Cell nuclei were counterstained with DAPI in blue.

and 5). Diminished $\alpha 2$ -3-sialylation was particularly obvious in the IPL (Figures 4F and H and 5B and C). In the ILM, a loss of both $\alpha 2$ -3- and $\alpha 2$ -6-linked sialic acids became apparent in the uveitic state (Figures 4H and J and 5C and D). By contrast, binding of

WGA, which served as a negative control since it binds primarily to GlcNAc and only to a small degree to the sialic acid Neu5Ac, was not significantly decreased (Figure 5A). These results indicate that the elevated expression of NEU1 in uveitis might result in

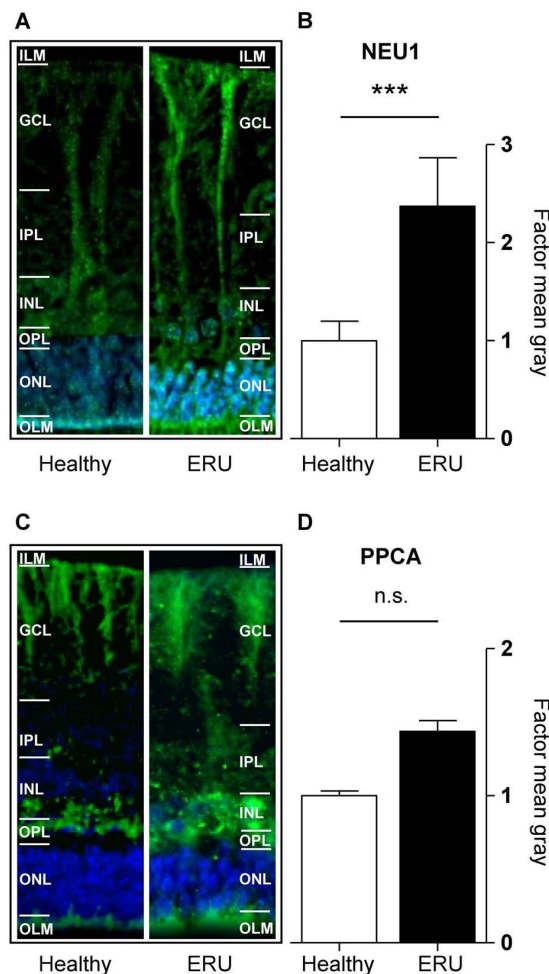


Fig. 3. NEU1 is more abundant in uveitic retina. Zoom-in images of Figure 1E and F show RMG (A) and illustrate increased expression of NEU1 throughout the cells in uveitis (right panel) compared to healthy controls (left panel). Quantification of fluorescence intensities of NEU1 in immunohistochemical stainings of healthy (white column) and uveitic (black column) retinas revealed significantly higher expression levels of NEU1 in uveitic state compared to controls ($***P \leq 0.001$). Expression pattern of PPCA in RMG (C) is displayed in zoom-in images of Figure 2E and F for healthy (left panel) and uveitic (right panel) condition. Quantification of PPCA signal (D) did not yield a significant difference between healthy (white column) and diseased (black column) (n.s., $P > 0.05$).

decreased terminal sialylation of uveitic retinal cells. This is of major interest because the sialylation state of cells has an important impact on their functions (Varki and Gagneux 2012; Möckl 2020), and to our knowledge desialylation was not described in uveitis so far.

While interpreting our results, we have to keep in mind that there are other enzymes besides NEU1, regulating the sialylation state of cells. Sialidases NEU2, NEU3 and NEU4 also catalyze the cleavage of sialic acids, but they differ in substrate specificity, tissue expression and intracellular localization (Miyagi and Yamaguchi 2012). While glycoproteins are the main substrates of NEU1 (Bonten et al. 1996; Miyagi and Yamaguchi 2012), NEU3 preferentially cleaves sialic

acids from gangliosides (Kopitz et al. 1996; Hasegawa et al. 2000). Since the organic solvents we used for the preparation of retina sections extract glycosphingolipids, such as gangliosides (Schwarz and Futerman 1997), we can conclude that in our experiments we demonstrated the cleavage of sialic acids from glycoproteins. However, we cannot exclude that gangliosides become desialylated as well in the course of ERU by NEU3. Since the retina exhibits a very diverse and unique ganglioside profile (Sibille et al. 2016) and the catabolization of gangliosides through NEU3 has important functions in the nervous system (Pan et al. 2017), these questions need to be addressed in future studies. Besides neuraminidases, sialyltransferases also play an essential role in regulating cell surface sialylation by catalyzing the transfer of sialic acid residues to the terminal position of glycoconjugates (Harduin-Lepers et al. 1995), thus having an opposite function to sialidases. This might explain, why in some parts of the retina, like the OLM, we observed a strong immunoreactivity for NEU1 in ERU (Figure 1F) without an apparent decrease of sialic acids (Figures 4 and 5). This phenomenon might be due to a higher expression or activity of sialyltransferases. However, our proteomic data revealed no higher abundance of sialyltransferases in RMG (Supplementary Table S1), but it cannot be excluded that other cell types of the retina contribute to the sialylation of cells by expressing sialyltransferases. While in the equine retina, NEU1 is primarily expressed in RMG (Figure 1), desialylation was not observed specifically in RMG, but throughout the retinal tissue (Figure 4). Since RMG span the entire thickness of the retina and are in close contact to the retinal neurons with their cell processes, it is reasonable to suggest that NEU1 on the cell surface of RMG could participate in the desialylation of the neighboring retinal cells. To date, this effect was not investigated in RMG and ocular diseases, but it was shown for other cells. Both in vivo and in vitro, NEU1 from activated polymorphonuclear leukocytes (PMNs) desialylated the surface of endothelial cells (ECs), resulting in the increased adhesion of PMN to the endothelium (Cross et al. 2003; Sakarya et al. 2004). Another explanation might be that retinal cells other than RMG express sialidases and thereby also contribute to the desialylation in uveitis. Which retinal cell types become desialylated in the course of uveitis and the direct substrate targets of NEU1 in the retina remain to be elucidated in future studies.

In uveitis, the consequences of retinal desialylation are unknown to date. It is conceivable that NEU1 could possibly mark an inflammatory phenotype of RMG, which leads to a pro-inflammatory microenvironment within the retina in ERU. Since immune cell activation and migration and destruction of the retinal tissue are the hallmarks of uveitis (Wiedemann et al. 2020), further attention should be paid to the potential role of desialylation in uveitis carried out by NEU1.

Furthermore, we hypothesize that the changes in retinal cell surface sialylation might impact the migration of immune cells. In uveitis, autoreactive T-cells migrate through the retina to the vitreous (Degroote et al. 2017). RMG abut to the ILM with their endfeet, thereby building the vitreo-retinal border that connects the retina and the vitreous body (Reichenbach and Bringmann 2020). Here, we have shown decreased α 2-3- and α 2-6-sialylation in uveitic retina, especially at the ILM (Figures 4H and J and 5C and D). This could be in association with the transmigration of immune cells through the retinal tissue toward the vitreous. Loss of cell surface sialylation of retinal cells might attract immune cells and enhance their migratory capacity. In PMNs, enhanced migration is associated with endogenous sialidase activity that results in the desialylation of PMNs and ECs and therefore promotes the adhesion of PMNs

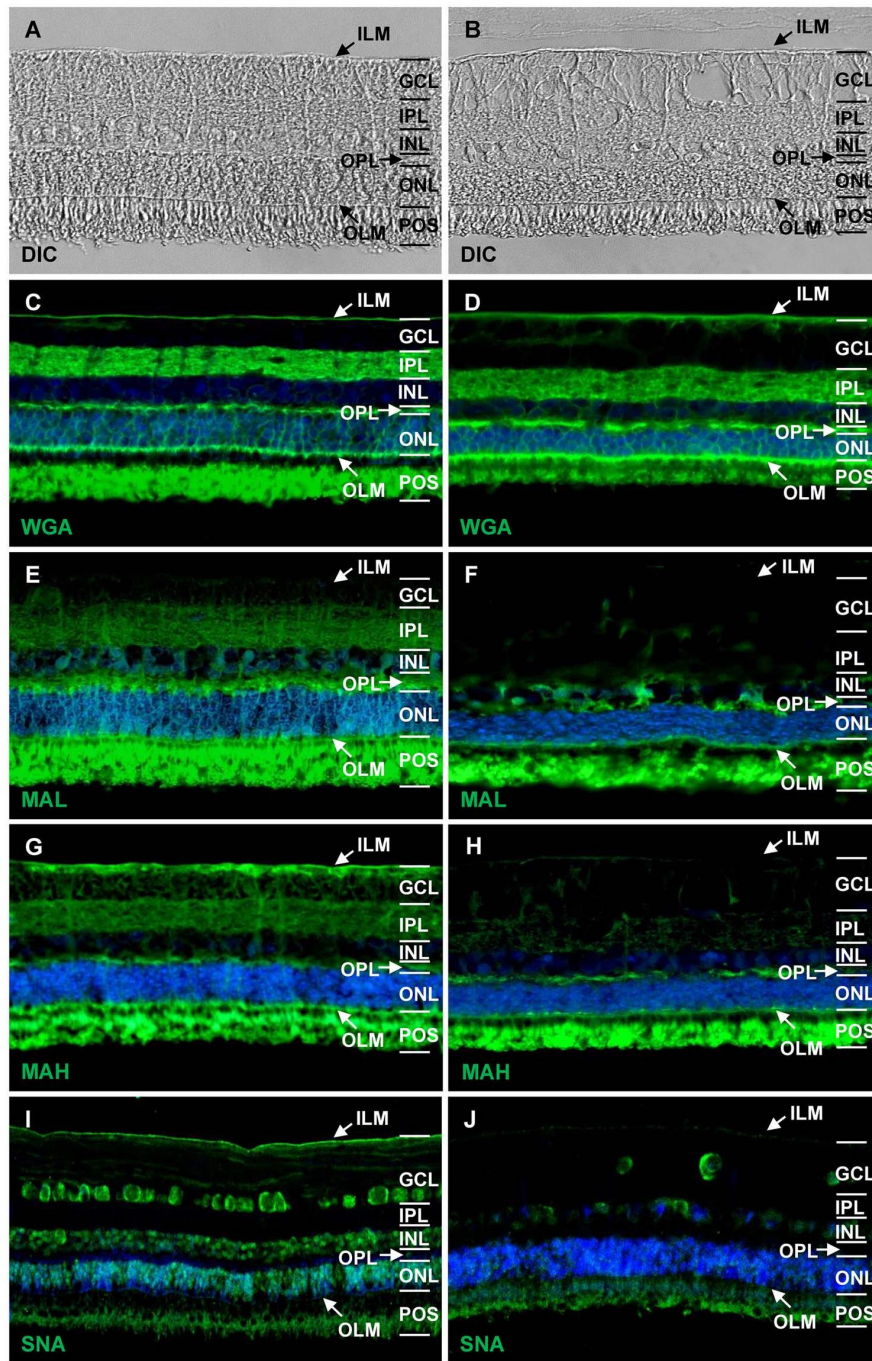


Fig. 4. Different binding patterns of lectins in healthy and uveitic retina indicate changes in surface sialylation. DIC of normal (A) and uveitic (B) retina with slightly damaged retinal structures in uveitic state (B). WGA (green), binding to GlcNAc and in a lesser extent to sialic acid, stained the limiting membranes and the plexiform layers (C, D) without apparent changes in uveitic retina (D). MAL (green) binds to α 2-3-linked sialic acids in *N*-linked glycans and showed strong immunoreactivity in both plexiform layers and the OLM in healthy retina (E). In uveitis, α 2-3-linked sialic acids were still detectable in the OPL and OLM, but almost completely disappeared in the IPL (F). MAH (green), binding to α 2-3-linked sialic acids in *O*-linked glycans, revealed strong binding capacity in the ILM, GCL, IPL and OPL in healthy controls (G), whereas in diseased state, α 2-3-linked sialic acids clearly decreased in the ILM, GCL and IPL (H). SNA (green), specific for α 2-6-linked sialic acids, was strongly positive in the ILM and in retinal ganglion cells as well as in the nuclear layers in healthy state (I). By contrast, α 2-6-linked sialic acids strongly decreased in uveitis, especially in the ILM (J). $\times 400$ magnification. Cell nuclei were counterstained with DAPI in blue.

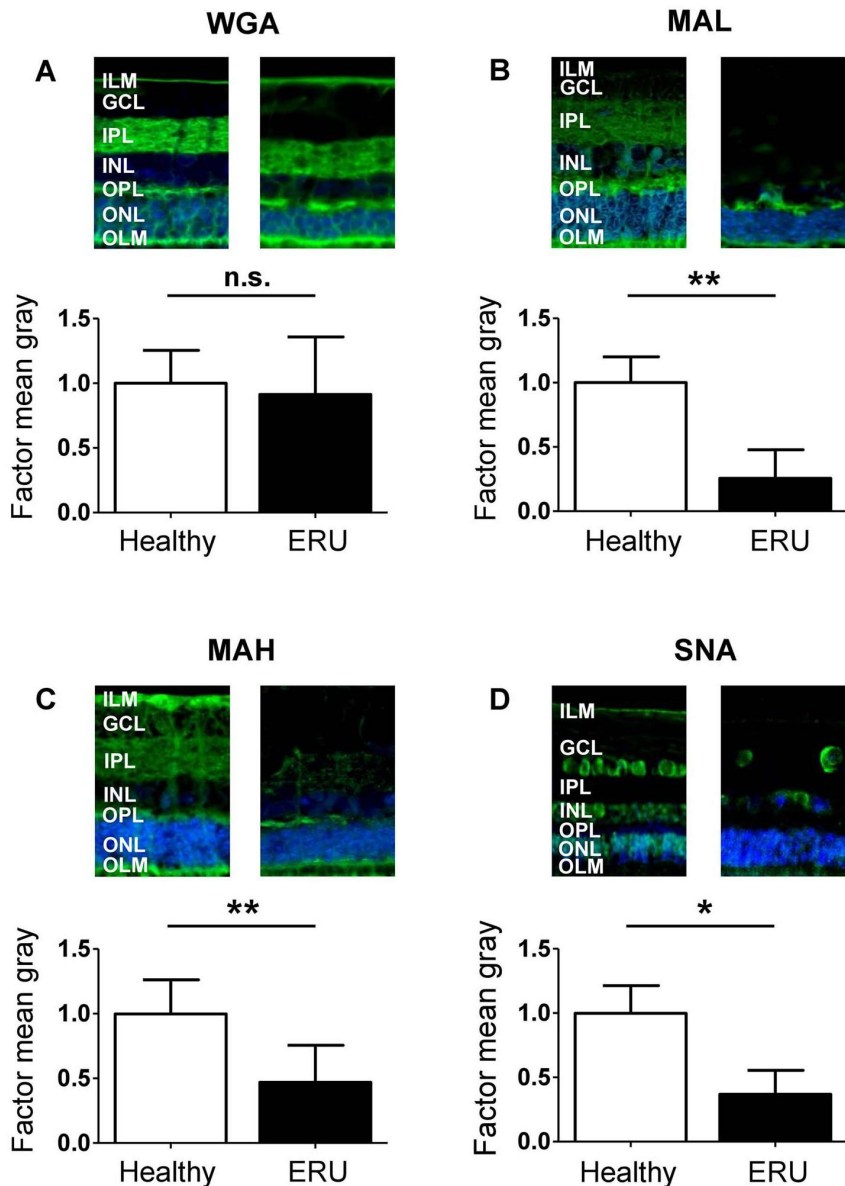


Fig. 5. Lectins MAL, MAH and SNA show significantly lower binding capacity in uveitis in contrast to WGA. Fluorescence intensity of WGA (A), which was used as a negative control, revealed no significant difference between healthy (white column) and uveitic (black column) retina (n.s., $P > 0.05$). By contrast, quantification of fluorescence intensities of sialic acid-binding lectins MAL (B), MAH (C) and SNA (D) confirmed a significant (** $P \leq 0.01$ for MAL and MAH and * $P \leq 0.05$ for SNA) decrease in uveitis (black columns) compared to healthy controls (white columns). Above the graphs, zoom-in images of respective lectin assays as shown in Figure 4 illustrate the decrease in binding capacity of sialic acid-binding lectins in uveitis (right panels) compared to healthy controls (left panels).

to the endothelium (Feng et al. 2011). Thus, activated immune cells in uveitis might adhere more efficiently to desialylated retinal cells, resulting in an enhanced transmigration rate through retinal tissue.

Findings in this study came from the biological replicates from a spontaneous disease, therefore the samples display the heterogeneity of retinal inflammation. Our data are of special value, since we analyzed RMG in their natural retinal surrounding. Rather than western blot, we preferred immunohistochemistry of retina sections for the

analysis and quantification of NEU1, PPCA and lectin binding. This is based on the fact that freshly isolated primary RMG from ERU horses, which in this case are the sample of choice for quantification via western blot, are hard to obtain and scarcely available. The use of retinal whole cell lysates for western blot analysis is not adequate in this case as it does not allow to clearly distinguish the changes of protein abundance between RMG and other retinal cells. Using immunohistochemistry, we could differentiate between the changes that occur specifically in RMG from the changes that relate to

other retinal cells. Thus, the significant differences in the NEU1 expression levels and α 2-3- and α 2-6-sialylation between healthy and uveitic retina suggest an essential role of these modifications in uveitis pathogenesis. In summary, our data point to a significant role of NEU1 expression changes in uveitic retina and concomitant desialylation of retinal cells.

Materials and methods

Retinal samples

For this study, a total of 15 control eyes and 12 ERU-diseased eyes were used. In detail, four control eyes and one ERU case were used for the separation of primary RMG and differential proteome analyses. Eleven control eyes and 12 ERU-diseased eyes from our tissue-biobank were used for immunohistochemistry (Deeg et al. 2016). Collection and use of equine eyes from the abattoir was approved for the purposes of scientific research by the appropriate board of the veterinary inspection office Munich, Germany (permit number: DE 09 162 0008-21). ERU specimens were derived from horses that were enucleated in the course of a therapeutical process in the equine hospital of LMU Munich or that had to be euthanized due to causes unrelated to this study. ERU was diagnosed based on the characteristic clinical signs of uveitis and a documented history of multiple recurrent episodes of ocular inflammation (Wollanke et al. 2001). All animals were treated according to the ethical principles and guidelines for scientific experiments on animals according to the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. No experimental animals were used in this study.

Sample preparation

Immediately after enucleation, eyecups were processed and the retina was dissected for the preparation of primary RMG as described previously (Eberhardt et al. 2012). Briefly, eyecups were cut open circumferentially and the anterior parts of the eye were removed. Retina was carefully detached from the vitreous residues and attached pigment epithelium. Mechanical disintegration of the retinal tissue was accomplished using micro-scissors, and the resulting fragments were enzymatically digested with papain (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 30 min at 37°C. For enzyme activation, papain was incubated with 1.1 μ M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.067 μ M mercaptoethanol and 5.5 μ M cysteine HCl prior to use. Enzymatical digestion was stopped by adding Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM, Pan Biotech, Aidenbach, Germany) with 10% of fetal bovine serum (FBS, Biochrom, part of Merck Millipore, Darmstadt, Germany). After the addition of desoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and trituration, cells were collected by centrifugation. Subsequently, cells were resuspended and seeded into 25-cm² tissue flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Pan Biotech). After allowing the cells to attach for 24 h, cells were purified through repeated washing and removal of the supernatant containing nonattached cells. Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂.

For proteomic analysis, supernatant was completely removed and the attached cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Cells were lysed with lysis buffer containing 1% NP40, 10 mM NaCl and 10 mM tris-HCl (pH: 7.6) and were de-attached using a cell scraper. Lysed cells were stored at -20°C until further processing.

For immunohistochemical staining, posterior eyecups were sliced and were embedded in paraffin as described before (Ehrenhofer et al. 2002).

Mass-spectrometric analysis

Protein concentration was determined using Bradford protein assay (Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany). From each sample, 10 μ g of total protein was digested with LysC and trypsin by filter-aided sample preparation (FASP) as previously described (Grosche et al. 2016). Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of digested samples was performed as previously described (Degroote et al. 2019). MS/MS spectra were subsequently searched against the Ensembl Horse protein database (release 89, Equ Cab 2, 24.849 sequences, <http://www.ensembl.org>) with Mascot (version 2.2, Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). Label-free quantification was performed with Progenesis software (version 2.5, Nonlinear Dynamics, Waters) as previously described (Hauck et al. 2017). Differential protein abundance was determined by the comparison of the mean normalized peptide abundance from the extracted ion chromatograms of ERU cases to controls.

Immunohistochemistry of retina sections

Paraffin-embedded tissues were sectioned (8 μ m) and mounted on coated slides (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Ulm, Germany). Heat antigen retrieval was performed at 99°C for 15 min in 0.1 M EDTA NaOH (pH 8.8) buffer. To prevent unspecific antibody binding, sections were blocked with TBS-T containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 5% goat serum. Blocking serum was accordingly chosen to the species in which the secondary antibodies were produced. For candidate detection in tissue, we used monoclonal mouse antivimentin antibody (Sigma-Aldrich, 1:400), followed by secondary goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) H + L antibody coupled to Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, 1:500) and polyclonal rabbit antibody specific for human NEU1 (Thermo Fisher Scientific, 5 mg/mL, sequence homology of 93% for horse as given by the manufacturer) and human CTSA (Thermo Fisher Scientific, 1:100), respectively. High sequence homology for both antibodies was confirmed using BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). In both cases, goat anti-mouse IgG H + L antibody coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:500) was used as the secondary antibody. For staining with lectins, biotinylated MAL-I and MAL-II, here referred to as MAL and MAH, respectively (Geisler and Jarvis 2011), and fluorescein-labeled WGA and SNA (all Linaris, Dossenheim, Germany, 1 μ g/mL) were used (Table II).

Target biotinylated lectins were visualized with fluorescein avidin D (Biozol, Eching, Germany, 10 μ g/mL). Cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, 1:1000), and the sections were mounted with glass coverslips using fluorescent mounting medium (Serva, Heidelberg, Germany). Fluorescent images were recorded with the Leica DMi8 microscope and LASX software, version 3.4.2 (both Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) was used for image processing.

Quantification of signal intensities

Fluorescence intensities of NEU1, PPCA and targets of lectins WGA, SNA, MAL and MAH in the immunohistochemical stainings of control samples and ERU cases were quantified using open source ImageJ 1.51 software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). For quantification,

factor mean gray was measured in representative areas, and the results were compared between healthy controls and ERU cases. Factor mean gray was used for statistical analysis of differences in staining intensity with Mann–Whitney *U* test (in case of no normal distribution) or Student's *t*-test (in case of normal distribution). Gaussian distribution was determined using the Kolmogorov–Smirnov test. Results were regarded as significant at $P \leq 0.05$. Significances were indicated by asterisks with $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ and $***P \leq 0.001$. Data were processed, analyzed and visualized using GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, California) and OriginPro 2020 (Additive, Friedrichsdorf, Germany).

Supplementary data

Supplementary data for this article is available online at <http://glycob.oxfordjournals.org/>.

Acknowledgements

The authors would like to thank Nicole and Heinrich Veit for providing eye samples as well as Herbert Kaltner, Joachim Manning, Kristina Kleinwort and Claudia Barfußler for critical discussions.

Funding

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the SPP 2127, projects DFG DE 719/7-1 to C.D., HA 6014/5-1 to S.M.H.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

BRB, blood-retinal barrier; BSA, bovine serum albumin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIC, differential interference contrast image; EC, endothelial cell; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ERU, equine recurrent uveitis; FASP, filter-aided sample preparation; GCL, ganglion cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GS, glutamine synthetase; IFN- γ , interferon γ ; IgG, immunoglobulin G; ILM, inner limiting membrane; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; MHC-II, major histocompatibility complex II; NEU1, neuraminidase 1; Neu5Ac, *N*-acetylneuraminic acid; OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; PBS, phosphate buffered saline; PMN, polymorphonuclear leukocytes; POS, photoreceptor outer segment; PPCA, protective protein cathepsin A; RMG, retinal Müller glial cells; SF, synovial fibroblast.

References

Allendorf DH, Franssen EH, Brown GC. 2020a. Lipopolysaccharide activates microglia via neuraminidase 1 desialylation of Toll-like Receptor 4. *J Neurochem* 155:403–416.

- Allendorf DH, Puigdemívol M, Brown GC. 2020b. Activated microglia desialylate their surface, stimulating complement receptor 3-mediated phagocytosis of neurons. *Glia*. 68:989–998.
- Amith SR, Jayanth P, Franchuk S, Finlay T, Seyranpate V, Beyaert R, Pshetzhtsky AV, Szewczuk MR. 2010. Neu 1 desialylation of sialyl α -2, 3-linked β -galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. *Cell Signal*. 22:314–324.
- Bonten E, van der Spoel A, Fornerod M, Grosveld G, d'Azzo A. 1996. Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. *Genes Dev*. 10:3156–3169.
- Bonten EJ, d'Azzo A. 2000. Lysosomal neuraminidase. Catalytic activation in insect cells is controlled by the protective protein/cathepsin A. *J Biol Chem*. 275:37657–37663.
- Bonten EJ, Annunziata I, d'Azzo A. 2014. Lysosomal multienzyme complex: Pros and cons of working together. *Cell Mol Life Sci*. 71:2017–2032.
- Bonten EJ, Campos Y, Zaitsev V, Nourse A, Waddell B, Lewis W, Taylor G, d'Azzo A. 2009. Heterodimerization of the sialidase NEU1 with the chaperone protective protein/cathepsin A prevents its premature oligomerization. *J Biol Chem*. 284:28430–28441.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. 2009. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res*. 28:423–451.
- Capozzi ME, Giblin MJ, Penn JS. 2018. Palmitic acid induces Müller cell inflammation that is potentiated by co-treatment with glucose. *Sci Rep*. 8:5459.
- Caspi RR. 2010. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest*. 120:3073–3083.
- Cross AS, Sakarya S, Rifat S, Held TK, Drysdale BE, Grange PA, Cassels FJ, Wang LX, Stamos N, Farese A et al. 2003. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem*. 278:4112–4120.
- Deeg CA, Ehrenhofer M, Thureau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. 2002. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res*. 75:127–133.
- Deeg CA, Amann B, Lutz K, Hirmer S, Lutterberg K, Kremmer E, Hauck SM. 2016. Aquaporin 11, a regulator of water efflux at retinal Müller glial cell surface decreases concomitant with immune-mediated gliosis. *J Neuroinflammation*. 13:89.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, Schmalzl T, Stangassinger M, Ueffing M. 2008. Equine recurrent uveitis—A spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res*. 40:151–153.
- Degroote RL, Weigand M, Hauck SM, Deeg CA. 2019. IL8 and PMA trigger the regulation of different biological processes in granulocyte activation. *Front Immunol*. 10:3064.
- Degroote RL, Uhl PB, Amann B, Krackhardt AM, Ueffing M, Hauck SM, Deeg CA. 2017. Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics*. 154:102–108.
- Dreyfus H, Preti A, Harth S, Pellicone C, Virmaux N. 1983. Neuraminidase in calf retinal outer segment membranes. *J Neurochem*. 40:184–188.
- Dreyfus H, Harth S, Urban PF, Mandel P, Preti A, Lombardo A. 1976. On the presence of a “particle-bound” neuraminidase in retina. A developmental study. *Life Sci*. 18:1057–1063.
- Eastlake K, Banerjee PJ, Angbohang A, Charteris DG, Khaw PT, Limb GA. 2016. Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia*. 64:495–506.
- Eberhardt C, Amann B, Feuchtinger A, Hauck SM, Deeg CA. 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*. 59:697–707.
- Eberhardt C, Amann B, Stangassinger M, Hauck SM, Deeg CA. 2012. Isolation, characterization and establishment of an equine retinal glial cell line: A prerequisite to investigate the physiological function of Müller cells in the retina. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 96:260–269.

- Ehrenhofer MCA, Deeg CA, Reese S, Liebich H-G, Stangassinger M, Kaspers B. 2002. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol.* 5:39–47.
- Feng C, Zhang L, Almulki L, Faez S, Whitford M, Hafezi-Moghadam A, Cross AS. 2011. Endogenous PMN sialidase activity exposes activation epitope on CD11b/CD18 which enhances its binding interaction with ICAM-1. *J Leukoc Biol.* 90:313–321.
- Geisler C, Jarvis DL. 2011. Letter to the glyco-forum: Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology.* 21:988–993.
- Grosche A, Hauser A, Lepper MF, Mayo R, von Toerne C, Merl-Pham J, Hauck SM. 2016. The proteome of native adult Müller glial cells from murine retina. *Mol Cell Proteomics.* 15:462–480.
- Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P. 1995. 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology.* 5:741–758.
- Hasegawa T, Yamaguchi K, Wada T, Takeda A, Itoyama Y, Miyagi T. 2000. Molecular cloning of mouse ganglioside sialidase and its increased expression in Neuro2a cell differentiation. *J Biol Chem.* 275:8007–8015.
- Hauck SM, Lepper MF, Hertl M, Sekundo W, Deeg CA. 2017. Proteome dynamics in biobanked horse peripheral blood derived lymphocytes (PBL) with induced autoimmune uveitis. *Proteomics.* 17:1–5.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Gerhards H, Ueffing M, Deeg CA. 2007. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res.* 6:2121–2131.
- Im E, Kazlauskas A. 2007. The role of cathepsins in ocular physiology and pathology. *Exp Eye Res.* 84:383–388.
- Karmakar J, Roy S, Mandal C. 2019. Modulation of TLR4 sialylation mediated by a sialidase Neu1 and impairment of its signaling in *Leishmania donovani* infected macrophages. *Front Immunol.* 10:1–19.
- Kopitz J, von Reitzenstein C, Sinz K, Cantz M. 1996. Selective ganglioside desialylation in the plasma membrane of human neuroblastoma cells. *Glycobiology.* 6:367–376.
- Läubli H, Varki A. 2020. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) detect self-associated molecular patterns to regulate immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 77:593–605.
- Malalana F, Stylianides A, McGowan C. 2015. Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *Vet J.* 206:22–29.
- Mano T, Tokuda N, Puro DG. 1991. Interferon-gamma induces the expression of major histocompatibility antigens by human retinal glial cells. *Exp Eye Res.* 53:603–607.
- Miyagi T, Yamaguchi K. 2012. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology.* 22:880–896.
- Möckl L. 2020. The emerging role of the mammalian glycocalyx in functional membrane organization and immune system regulation. *Front Cell Dev Biol.* 8:1–14.
- Nagata Y, Burger MM. 1974. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem.* 249:3116–3122.
- Nan X, Carubelli I, Stamatou NM. 2007. Sialidase expression in activated human T lymphocytes influences production of IFN- γ . *J Leukoc Biol.* 81:284–296.
- Natoli R, Fernando N, Madigan M, Chu-Tan JA, Valter K, Provis J, Rutar M. 2017. Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Mol Neurodegener.* 12:31.
- Pan X, de Britto Pará de Aragão C, Velasco-Martin JP, Priestman DA, Wu HY, Takahashi K, Yamaguchi K, Sturiale L, Garozzo D, Platt FM *et al.* 2017. Neuraminidases 3 and 4 regulate neuronal function by catabolizing brain gangliosides. *FASEB J.* 31:3467–3483.
- Reichenbach A, Bringmann A. 2020. Glia of the human retina. *Glia.* 68:768–796.
- Rutar M, Natoli R, Chia RX, Valter K, Provis JM. 2015. Chemokine-mediated inflammation in the degenerating retina is coordinated by Müller cells, activated microglia, and retinal pigment epithelium. *J Neuroinflammation.* 12:8.
- Sakarya S, Rifat S, Zhou J, Bannerman DD, Stamatou NM, Cross AS, Goldblum SE. 2004. Mobilization of neutrophil sialidase activity desialylates the pulmonary vascular endothelial surface and increases resting neutrophil adhesion to and migration across the endothelium. *Glycobiology.* 14:481–494.
- Schwarz A, Futerman AH. 1997. Determination of the localization of gangliosides using anti-ganglioside antibodies: Comparison of fixation methods. *J Histochem Cytochem.* 45:611–618.
- Seyrantepe V, Iannello A, Liang F, Kanshin E, Jayanth P, Samarani S, Szcwczuk MR, Ahmad A, Pshezhetsky AV. 2010. Regulation of phagocytosis in macrophages by neuraminidase 1. *J Biol Chem.* 285:206–215.
- Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem.* 262:1596–1601.
- Sibille E, Berdeaux O, Martine L, Bron AM, Creuzot-Garcher CP, He Z, Thuret G, Bretillon L, Masson EA. 2016. Ganglioside profiling of the human retina: Comparison with other ocular structures, brain and plasma reveals tissue specificities. *PLoS One.* 11:1–22.
- Tsirouki T, Dastiridou A, Symeonidis C, Tounakaki O, Brazitikou I, Kalogeropoulos C, Androudi S. 2018. A focus on the epidemiology of uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 26:2–16.
- van der Spoel A, Bonten E, d'Azzo A. 1998. Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A. *EMBO J.* 17:1588–1597.
- Varki A, Gagneux P. 2012. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 1253:16–36.
- Wang D, Ozhegov E, Wang L, Zhou A, Nie H, Li Y, Sun X-L. 2016. Sialylation and desialylation dynamics of monocytes upon differentiation and polarization to macrophages. *Glycoconj J.* 33:725–733.
- Wiedemann C, Amann B, Degroote RL, Witte T, Deeg CA. 2020. Aberrant migratory behavior of immune cells in recurrent autoimmune uveitis in horses. *Front Cell Dev Biol.* 8:101.
- Wollanke B, Rohrbach BW, Gerhards H. 2001. Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis. *J Am Vet Med Assoc.* 219:795–800.

4 PUBLIKATION II

Titel

Cell Surface Profiling of Retinal Müller Glial Cells Reveals Association to Immune Pathways after LPS Stimulation

Autoren

Lea Lorenz, Sieglinde Hirmer, Adrian Schmalen, Stefanie M. Hauck und Cornelia A. Deeg

Journal

Cells

Status

Publiziert.

Cells 2021, Mar23;10(3), 711.

doi: 10.3390/cells10030711

<https://doi.org/10.3390/cells10030711>



Article

Cell Surface Profiling of Retinal Müller Glial Cells Reveals Association to Immune Pathways after LPS Stimulation

Lea Lorenz ¹, Sieglinde Hirmer ¹, Adrian Schmalen ², Stefanie M. Hauck ^{2,†} and Cornelia A. Deeg ^{1,*,†}

¹ Chair of Physiology, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, 82152 Martinsried, Germany; Lea.Lorenz@tph.vetmed.uni-muenchen.de (L.L.); sieglinde.hirmer@tph.vetmed.uni-muenchen.de (S.H.)

² Research Unit Protein Science, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health (GmbH), 80939 Munich, Germany; adrian.schmalen@helmholtz-muenchen.de (A.S.); hauck@helmholtz-muenchen.de (S.M.H.)

* Correspondence: Cornelia.Deeg@lmu.de; Tel.: +49-89-2180-2551

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Retinal Müller glial cells (RMG) are involved in virtually every retinal disease; however, the role of these glial cells in neuroinflammation is still poorly understood. Since cell surface proteins play a decisive role in immune system signaling pathways, this study aimed at characterizing the changes of the cell surface proteome of RMG after incubation with prototype immune system stimulant lipopolysaccharide (LPS). While mass spectrometric analysis of the human Müller glia cell line MIO-M1 revealed 507 cell surface proteins in total, with 18 proteins significantly more abundant after stimulation (ratio ≥ 2), the surfaceome of primary RMG comprised 1425 proteins, among them 79 proteins with significantly higher abundance in the stimulated state. Pathway analysis revealed notable association with immune system pathways such as “antigen presentation”, “immunoregulatory interactions between a lymphoid and a non-lymphoid cell” and “cell migration”. We could demonstrate a higher abundance of proteins that are usually ascribed to antigen-presenting cells (APCs) and function to interact with T-cells, suggesting that activated RMG might act as atypical APCs in the course of ocular neuroinflammation. Our data provide a detailed description of the unstimulated and stimulated RMG surfaceome and offer fundamental insights regarding the capacity of RMG to actively participate in neuroinflammation in the retina.

Keywords: retinal Müller glial cells; MIO-M1; neuroinflammation; LPS; cell surface proteomics; LC-MS/MS; ocular inflammation; immune capacity of RMG; atypical APC



Citation: Lorenz, L.; Hirmer, S.; Schmalen, A.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. Cell Surface Profiling of Retinal Müller Glial Cells Reveals Association to Immune Pathways after LPS Stimulation. *Cells* **2021**, *10*, 711. <https://doi.org/10.3390/cells10030711>

Academic Editor: Kyoungso Suk

Received: 25 February 2021

Accepted: 19 March 2021

Published: 23 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, retinal Müller glial cells (RMG) have gained increasing attention, as they are involved in virtually every retinal disease and represent valuable therapeutic targets (reviewed in [1–4]). RMG are the principal macroglial cells of the retina [5] and span its entire thickness from the inner to the outer limiting membrane [6]. Thus, they are in close contact to the vitreous, the subretinal space and retinal blood vessels, while they also enclose all retinal neurons with their cell processes [1,7]. Under physiological conditions, RMG are involved in maintaining retinal water-, pH- and ion- homeostasis [7,8], and they contribute to the blood–retinal barrier (BRB) with their endfeet [9]. Furthermore, they support retinal neurons by recycling neurotransmitters [5,10] and supplying them with nutrients [1,11,12]. In the case of retinal trauma or disease, they undergo a phenotypic transformation and become gliotic [13]. Gliosis is regarded as a cellular attempt to impede further tissue damage after an insult or to repair affected retinal tissue [14]. It has been demonstrated that, under pathological conditions, RMG actively participate in the immune response, acting as antigen-presenting cells (APCs) and releasing various pro-inflammatory cytokines [15–19]. However, little is known about their exact role in ocular immune response and the consequences of their activation. We previously showed

that RMG were activated in the course of autoimmune uveitis in horses, resulting in IFN- γ expression and the downregulation of cell-specific proteins such as glutamine-synthetase (GS), aquaporins 5 and 11 and potassium channel Kir4.1, thus playing a detrimental role in disease pathogenesis [19–22]. In order to gain further insight into the capacity of RMG to transform into an activated phenotype upon a danger signal, we carried out an in-depth analysis of the RMG surfaceome after stimulation with prototype immune system stimulant lipopolysaccharide (LPS). In our study, we performed a glyco-capture proteomics approach, which allowed us to selectively analyze the RMG surfaceome. Since cell surface proteins carry out important functions, such as receptor signaling, communication between cells and cell adhesion (reviewed in [23–25]), they play a crucial role in immune system signaling pathways. For our experiments, we used liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), which has proven to be a powerful tool for the in-depth analysis of cell surface proteins [26–28]. In order to compare the reactive capacity of primary RMG and a Müller glia cell line, we performed our mass spectrometric analysis on both primary equine RMG and the permanent human Müller glia cell line MIO-M1 [29]. Our results demonstrate that the RMG surfaceome changes considerably in response to immune stimulation and thus provide fundamental knowledge about the contribution of RMG to immune system signaling.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection and Preparation

For this study, four control eyes from healthy horses were collected from a local abattoir. Collection and use of equine eyes from the abattoir were approved for purposes of scientific research by the appropriate board of the veterinary inspection office, Munich, Germany. No experimental animals were involved in this study. Eyes were processed immediately after enucleation. After removal of residual periocular tissue, eyeballs were rinsed in 70% ethanol followed by washing in cold PBS and storing in DMEM until further use. Preparation of primary RMG was conducted under a laminar flow hood with sterile instruments as previously described [30]. Briefly, eyeballs were cut open circumferentially parallel to the limbus corneae, and anterior parts of the eyes were removed. Retina was carefully detached from the vitreous and the attached pigment epithelium and mechanically disintegrated using microscissors. Resulting fragments were enzymatically digested at 37 °C with papain that had been activated by incubation with 1.1 μ M EDTA, 0.067 μ M mercaptoethanol and 5.5 μ M cysteine-HCl prior to use. Enzymatical digestion was stopped after 30 min by adding Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM, Pan Biotech, Aidenbach, Germany) with 10% fetal bovine serum (FBS, Biochrom, Darmstadt, Germany). After addition of Desoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), cells were first triturated and then collected by centrifugation (100 \times g, 10 min). Subsequently, cells were resuspended and seeded into 25 cm² tissue flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Pan Biotech). After allowing the cells to adhere for 24 h, thorough panning of the flasks followed by removal of the supernatant was performed in order to eliminate nonattached neuronal cells. The efficiency of this method to yield pure RMG cultures has been demonstrated previously [30,31]. Cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ with repeated medium exchange until reaching confluence. Phase-contrast microscopy was used to determine the extent of confluence as well as to monitor the purity of growing cell population by verification of homologous morphology as previously described [29,30]. The human Müller cell line Moorfields/Institute of Ophthalmology- Müller 1 (MIO-M1) was obtained from G. A. Limb [29] and grown to approximately 80% confluency at 37 °C and 5% CO₂ with repeated medium exchanges.

2.2. Stimulation of Cells and Biotinylation of Cell Surface Proteins

For the following experiments, seven T75 flasks with pooled adherent primary equine RMG or MIO-M1 cells were used. For both cell types, three of them were used for stimula-

tion with LPS (Sigma-Aldrich), and cells of three flasks served as negative controls, whereas the cells of the remaining flask were not biotinylated and thus were used as a negative control for biotinylation. Prior to stimulation with LPS, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated at 37 °C in DMEM without FBS for starvation. After 2 h, supernatant was removed and replaced with fresh DMEM not containing FBS. LPS was added to three flasks at a final concentration of 10 µg/mL. Negative controls were incubated at the same conditions without addition of LPS. After 24 h at 37 °C, supernatant was removed, and cells were washed twice with PBS—the first time with prewarmed PBS (pH 7.4) and the second time with PBS with an adjusted pH of 6.7, containing 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂. Cell surface membrane proteins were then labelled with 2 mL of biotinylation reagent per flask, containing 309.6 µL aminoxy-biotin (VWR, International GmbH, Darmstadt, Germany), 24 µL NaIO₄ and 11.04 µL aniline (Sigma-Aldrich) in labeling buffer (PBS, pH 6.7) and incubated in the dark for 30 min at 4 °C. The biotinylation reaction was quenched by adding glycerol to a final concentration of 1 mM for an additional 5 min at 4 °C. Subsequently, medium was removed, and cells were washed with washing buffer (PBS with 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂, pH 7.4) before scraping the cells carefully into 500 µL lysis buffer (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), a 1× complete protease inhibitor mixture, EDTA-free (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) in HPLC-grade water) and immediately frozen at −20 °C.

2.3. Preparation of Plasma Membrane Fraction and Protein Extraction from Affinity-Purified Plasma Membrane

To enrich biotinylated cell surface and cell membrane fractions, lysates were thawed on ice for 30 min and vortexed before centrifugation at 16,000× *g* at 4 °C for 10 min. The supernatant was diluted 1:5 with washing buffer, and the pellet was discarded. Streptavidin beads (IBA GmbH, Göttingen, Germany) were prewashed 3 times with lysis buffer diluted 1:5 with washing buffer and centrifuged between the washing steps at 1000× *g* for 1 min. Then, samples were added to the washed streptavidin beads in LoBind tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and incubated at 4 °C for 2 h on a rotator for binding of biotinylated proteins to high-affinity streptavidin beads. Subsequently, extensive washing and incubation steps were performed, each in a volume of 500 µL to remove nonspecifically bound proteins. Centrifugation was carried out at 2500× *g* for 2 min as part of the washing process. First, beads were washed with lysis buffer diluted 1:5 with washing buffer, followed by a washing step with 0.5% SDS in washing buffer and incubation with 0.5% SDS and 100 mM DTT in washing buffer for 30 min at room temperature. Next, beads were washed with UC buffer (6 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5) and subsequently incubated with UC buffer containing 50 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature for alkylation. This was followed by washing steps in UC buffer, 5 M NaCl, 100 mM Na₂CO₃ (pH 11.5) and 50 mM Tris-HCl (pH 8.5). For proteolysis, bead–protein complexes were incubated in 100 µL Tris-HCl (pH 8.5) containing 2.5 µg sequencing grade modified trypsin (Promega, Walldorf, Germany) at 37 °C overnight. Subsequently, the tryptic peptides were collected by centrifugation at 2000× *g* for 2 min before beads were resuspended in 50 µL 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), followed by another centrifugation step. Supernatants resulting from both steps with the tryptic peptides therein were pooled together into a new LoBind tube (Eppendorf) and acidified with trifluoroacetic acid (TFA). To elute the glycopeptides, the beads were washed with 100 µL 1× G7 buffer and then incubated in 50 µL 1× G7 buffer containing 500 U glycerol-free PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt a. Main, Germany) for 6 h at 37 °C, followed by centrifugation. Resulting supernatant was transferred into a new LoBind tube, and beads were resuspended in 50 µL 1× G7 buffer and centrifuged again. Resulting eluates from both steps were pooled in LoBind tubes (Eppendorf) and dried. Finally, dried glycopeptides were resolved in the acidified tryptic peptides and analyzed as combined samples by LC-MS/MS.

2.4. Mass Spectrometric Analysis

LC-MS/MS analysis of RMG surfaceomes was performed on an Ultimate3000 nano-HPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA) online coupled to a LTQ OrbitrapXL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) by a nanospray ion source. Acidified eluted fractions were loaded automatically to a HPLC system equipped with a nanotrap column, eluted after 5 min and separated on the analytical column (75 μm inner diameter \times 25 cm, Acclaim PepMap100 C18, 3 μm , 100 \AA) by a 265 min gradient flow at a flow rate of 300 nL/min from 2 to 40 percent ACN. Peptides were analyzed by the LTQ OrbitrapXL, recording MS spectra at a resolution of 60,000 in profile mode. From the high-resolution MS prescan, the ten most intense peptide ions were selected for fragment analysis in the linear ion trap if they exceeded an intensity of at least 200 counts and if they were at least doubly charged. The normalized collision energy for CID was set to a value of 35, and the resulting fragments were detected with normal resolution in the linear ion trap in centroid mode. Dynamic exclusion was set to 60 s.

2.5. Data Analysis

Acquired MS spectral files were imported to Progenesis QI software (Nonlinear Dynamics, Waters, Newcastle upon Tyne, UK), and label-free quantitative analysis was performed as previously described [32,33]. All MS/MS spectra were exported from Progenesis QI software as Mascot generic files (mgf) and searched against Ensembl horse or human protein database, respectively (<https://www.ensembl.org>, accessed on 18 March 2021), for peptide identification with Mascot (<https://www.matrixscience.com/>, accessed on 18 March 2021). Search parameters used were 10 ppm peptide mass tolerance, one Da fragment mass tolerance and one missed cleavage allowed. Iodoacetamide derivatives of cysteines were set as stable modifications, and methionine oxidation as well as asparagine and glutamine deamidation were allowed as variable modifications. A Mascot integrated decoy database search calculated an average false discovery rate < 1% when searches were performed with a Mascot percolator cut-off score of 13 and with an appropriate significance threshold (p). Identifications were re-imported into Progenesis QI. Detailed information on all identified proteins is provided in Supplementary Tables S1 and S2.

2.6. Data Processing

Proteins were considered differentially abundant when LPS/unstimulated control ratio was at least 2. For statistical analysis, transformed normalized abundances were used for one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. The volcano plots were created with OriginPro 2020 software (Additive, Friedrichsdorf, Germany). Pathway enrichment analyses were performed on human orthologs of gene names using open-source software ShinyGO (v0.61, <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>, accessed on 18 March 2021) with the following settings: search species human, p -value cutoff (FDR) 0.05, number of most significant terms to show 30. The p -value for enrichment analysis was calculated via hypergeometric distribution followed by FDR correction. Voronoi visualization of pathway analyses was conducted using open-source software Reactome (v75, <https://reactome.org>, accessed on 18 March 2021). In MIO-M1 cells, 2 identifiers could not be found in Reactome (CD82 and PODXL), whereas in primary RMG, 9 proteins could not be identified and thus were not included in pathway analyses, namely, CD82, CLMP, DMRTC2, HIRIP3, LRPAP1, MGARP, TMEM33, TSPAN6 and VASN.

3. Results

3.1. Mass Spectrometric Analysis Reveals 507 Cell Surface Proteins in Human Müller Glia Cell Line MIO-M1 and 1425 in Primary RMG

Using mass spectrometry, we identified 507 cell surface proteins in cells of the human retinal Müller glia cell line MIO-M1 (Supplementary Table S1) and 1425 proteins in the surfaceome of primary equine RMG (Supplementary Table S2).

3.2. Stimulation with LPS Results in Distinct Changes of RMG Surface Proteome

To assess the capacity of RMG to respond to immune stimuli, MIO-M1 cells as well as primary RMG were stimulated with LPS for 24 h. Mass spectrometry revealed distinct changes of protein abundances after LPS stimulation (Table 1 and Figure 1). For further analyses, a two-fold change in abundance after stimulation with LPS was set as the cut-off value, and protein abundance change was regarded as significant at $p \leq 0.05$. Following these criteria, we identified 18 proteins with significantly higher abundance after LPS stimulation in the MIO-M1 cell line (Table 1 and Figure 1A, green dots) and six proteins that showed lower abundance after co-incubation with LPS (Figure 1A, red dots). In contrast, the cell surfaceome of primary RMG comprised 79 identifications with higher abundance after LPS (Table 1 and Figure 1B, green dots), among them four proteins that belong to the MHC class I family, while 82 proteins showed significantly lower abundance after in vitro stimulation (Figure 1B, red dots). While there was no overlap between primary RMG and MIO-M1 cells within the less abundant proteins, six candidates were significantly more abundant concomitantly in both cell types (Figure 1A,B, labeled with their gene names in blue font). These proteins comprised the leukocyte antigen Class I-B (HLA-B), inducible T-cell co-stimulatory ligand (ICOSLG), the tetraspanin CD82 and adhesion molecules intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) and junctional adhesion molecule 2 (JAM2), all of which have a function in immune system signaling.

Table 1. Proteins from mass spectrometry dataset with statistically significant ($p \leq 0.05$) abundance changes (ratio ≥ 2) after LPS stimulation (1) in MIO-M1 cells and (2) in primary retinal Müller glial cells (RMG).

Protein ID	Description	Gene Name	Peptides Used for Quantification	p-Value	Ratio LPS/Unstim
(1) MIO-M1					
ENSP0000006053	C-X3-C motif chemokine ligand 1	CX3CL1	4	0	46
ENSP00000339477	Inducible T cell costimulator ligand	ICOSLG	9	0	30.1
ENSP00000264832	Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	29	0	27.7
ENSP00000294728	Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	47	0	11
ENSP00000318416	Junctional adhesion molecule 2	JAM2	1	0.01	5.7
ENSP00000166534	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	P4HA2	2	0.047	4.7
ENSP00000412429	Transgelin 2	TAGLN2	2	0.045	4.5
ENSP00000399168	Major histocompatibility complex, class I, B	HLA-B	2	0.005	4.1
ENSP00000304592	Fatty acid synthase	FASN	1	0.047	3.4
ENSP00000336799	Tubulin alpha 1b	TUBA1B	2	0.015	3.2
ENSP00000341289	Tubulin beta 4B class IVb	TUBB4B	2	0.028	2.8
ENSP00000240095	Solute carrier family 39 member 14	SLC39A14	13	0.004	2.6
ENSP00000330054	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	3	0.033	2.4
ENSP00000307046	Syndecan 2	SDC2	3	0.03	2.2
ENSP00000227155	CD82 molecule	CD82	8	0.018	2.2
ENSP00000245185	Metallothionein 2A	MT2A	1	0.039	2.2
ENSP00000319782	Podocalyxin like	PODXL	10	0.004	2.1
ENSP00000380855	Programmed cell death 1 ligand 2	PDCD1LG2	2	0.021	2
(2) Primary RMG					
ENSECAP00000013197	TAP binding protein	TAPBP	1	0	infinity
ENSECAP00000010634	SLAM family member 7	SLAMF7	1	0.039	158.6
ENSECAP00000009810	5,-nucleotidase, cytosolic IIIA	NT5C3A	1	0.035	107.7
ENSECAP00000009600	Transmembrane protein 33	TMEM33	1	0.044	33.8
ENSECAP00000018879	Neuregulin 1	NRG1	2	0	30.5
ENSECAP00000014003	CD274 molecule	CD274	2	0	26.4
ENSECAP00000019916	Betacellulin	BTC	1	0.002	22.4

Table 1. Cont.

Protein ID	Description	Gene Name	Peptides Used for Quantification	p-Value	Ratio LPS/Unstim
ENSECAP0000000924	ISG15 ubiquitin like modifier	ISG15	7	0	21.1
ENSECAP00000011996	Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	25	0	19.9
ENSECAP00000009944	CD86 molecule	CD86	7	0	19.9
ENSECAP00000014290	Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	51	0	16.3
ENSECAP00000004905	<i>Doublesex- and mab-3-related transcription factor C2</i>	<i>DMRTC2</i>	1	0.01	15.9
ENSECAP00000017760	Neuromedin U receptor 2	NMUR2	2	0	15.7
ENSECAP00000011171	2,-5-oligoadenylate synthetase 1	OAS1	2	0	14
ENSECAP00000000811	Beta-2-microglobulin	B2M	1	0.026	13.4
ENSECAP00000010646	MX dynamin like GTPase 2	MX1	8	0.002	13.4
ENSECAP00000021590	MHC class I heavy chain	HLA-A	3	0.002	13.1
ENSECAP00000018982	Guanylate binding protein 5	GBP5	10	0	12.6
ENSECAP00000009324	Serum amyloid A1	SAA1	3	0.018	12.2
ENSECAP00000020078	MHC class I heavy chain	HLA-A	11	0.001	12.2
ENSECAP00000006405	Interferon induced with helicase C domain 1	IFIH1	22	0.001	12
ENSECAP00000020119	Very low-density lipoprotein receptor	VLDLR	1	0.001	10.5
ENSECAP00000003048	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	6	0	10
ENSECAP00000009264	MHC class I heavy chain	HLA-A	7	0.002	9.5
ENSECAP00000008591	ATP binding cassette subfamily A member 1	ABCA1	1	0.048	9.2
ENSECAP00000015028	Carbonic anhydrase 12	CA12	3	0.004	9.1
ENSECAP00000016719	Pleckstrin	PLEK	3	0.002	9
ENSECAP00000019669	DEXD/H-box helicase 58	DDX58	18	0.001	8.9
ENSECAP00000002356	MHC class I heavy chain	HLA-A	1	0	8.7
ENSECAP00000006671	Semaphorin 4A	SEMA4A	2	0.006	8.7
ENSECAP00000022282	Intercellular adhesion molecule 3	ICAM3	3	0.003	8.5
ENSECAP00000017347	Versican	VCAN	4	0.006	8.4
ENSECAP00000014907	CD40 molecule	CD40	8	0.001	8.2
ENSECAP00000000620	Galectin 3 binding protein	LGALS3BP	2	0.004	7.9
ENSECAP00000007529	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3	DNAJC3	1	0.001	7.2
ENSECAP00000012605	HIRA interacting protein 3	HIRIP3	1	0	6.8
ENSECAP00000010541	MHC class II DR alpha chain	HLA-DRA	2	0.015	6.6
ENSECAP00000006847	Inducible T cell costimulator ligand	ICOSLG	4	0.009	6.4
ENSECAP00000008012	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	IFIT3	3	0	6.1
ENSECAP00000017943	Syndecan 4	SDC4	4	0.017	5.6
ENSECAP00000017562	CXADR like membrane protein	CLMP	3	0.046	5.4
ENSECAP00000003412	Major prion protein	PRNP	2	0.016	5.3
ENSECAP00000017893	CD82 molecule	CD82	7	0.003	4.9
ENSECAP00000015940	C-X-C motif chemokine ligand 16	CXCL16	1	0	4.8
ENSECAP00000019909	MHC class II DR-beta chain	HLA-DRB1	1	0.001	4.7
ENSECAP00000018161	MHC class I heavy chain	HLA-C	2	0.03	4.2
ENSECAP00000006146	Praja ring finger ubiquitin ligase 2	PJA2	2	0.027	4.2
ENSECAP00000010650	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C8	DNAJC8	1	0.017	4.1
ENSECAP00000001275	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	CEACAM21	9	0	3.9
ENSECAP00000015833	Lumican	LUM	1	0.029	3.8
ENSECAP00000018257	CD38 molecule	CD38	2	0.009	3.7
ENSECAP00000017093	Versican	VCAN	5	0.004	3.7
ENSECAP00000002944	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5	IFIT5	7	0.001	3.6

Table 1. Cont.

Protein ID	Description	Gene Name	Peptides Used for Quantification	p-Value	Ratio LPS/Unstim
ENSECAP00000016198	Folate receptor beta	FOLR2	1	0.034	3.5
ENSECAP00000012733	Junctional adhesion molecule 2	JAM2	2	0.012	3.4
ENSECAP00000011113	Guanylate-binding protein 6	GBP6	9	0.006	3.3
ENSECAP00000007853	Signal transducer and activator of transcription 1	STAT1	14	0.034	3.3
ENSECAP00000014392	Endothelin converting enzyme 1	ECE1	17	0.006	3.2
ENSECAP00000002864	Vasorin	VASN	16	0.004	3.1
ENSECAP00000009001	Integrin subunit alpha 4	ITGA4	9	0.008	3.1
ENSECAP00000015309	Colony stimulating factor 1	CSF1	5	0.009	3
ENSECAP00000002058	Sphingosine-1-phosphate receptor 3	S1PR3	2	0.039	3
ENSECAP00000001010	<i>Hydroxycarboxylic acid receptor 2</i>	<i>HCAR2</i>	2	0.004	2.9
ENSECAP00000019459	Mitochondria localized glutamic acid rich protein	MGARP	1	0.034	2.9
ENSECAP00000001529	CD80 molecule	CD80	1	0.014	2.8
ENSECAP00000017208	Solute carrier family 1 member 3	SLC1A3	12	0.008	2.5
ENSECAP00000012239	Solute carrier family 20 member 1	SLC20A1	2	0.01	2.5
ENSECAP00000019326	Tissue factor pathway inhibitor	TFPI	2	0.037	2.4
ENSECAP00000019780	MHC class I heavy chain	HLA-B	7	0.007	2.4
ENSECAP00000005675	Plasminogen activator, urokinase	PLAU	5	0.001	2.4
ENSECAP00000000171	Semaphorin 7A	SEMA7A	1	0.002	2.4
ENSECAP00000011356	CD53 molecule	CD53	2	0.037	2.2
ENSECAP00000012737	LDL receptor related protein associated protein 1	LRPAP1	3	0.005	2.2
ENSECAP00000008846	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	EGFR	22	0.05	2.1
ENSECAP00000002079	CD68 molecule	CD68	2	0.008	2
ENSECAP00000006770	Tetraspanin 6	TSPAN6	2	0.007	2
ENSECAP00000016635	CD47 molecule	CD47	5	0.026	2
ENSECAP00000019515	Mannose-6-phosphate receptor, cation dependent	M6PR	2	0.015	2
ENSECAP00000004902	Slit guidance ligand 3	SLIT3	4	0.007	2

Column 1 (protein ID) contains the accession number of the identified protein and column 2 (description) the respective protein name, both as listed in the Ensembl protein database (<http://www.ensembl.org>, accessed on 18 March 2021). Column 3 (gene name) contains the name of the human orthologue gene. Italicized names display proteins originally listed as uncharacterized proteins in the Ensembl database output or differently named as in later manual search. Searching by accession number in the Universal Protein Resource database (<https://www.uniprot.org>, accessed on 18 March 2021) or in the ncbi Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 18 March 2021) provided the description for these proteins. Column 4 (peptides used for quantification) displays the number of unique peptides used for quantification. Column 5 shows the p-value as calculated by ANOVA. Column 6 (ratio) contains the fold change of the protein abundance after LPS stimulation compared to unstimulated controls. Proteins that are referred to in the text are illustrated in bold.

3.3. Proteins with Higher Abundance in Stimulated RMG Associated with Immune System Pathways

To take a closer look at the reactions of RMG to prototype immune system stimulant LPS, we selected proteins with significantly higher abundance after LPS stimulation in the MIO-M1 cell line and in primary RMG for pathway analyses. Enrichment analysis using open-source software ShinyGO revealed a strong association with immune system pathways (Figure 2). Proteins with higher abundance in stimulated MIO-M1 cells were allocated primarily to cell-adhesion processes (Figure 2A), whereas proteins of primary RMG clustered predominantly to the pathways “immune system process”, “cellular response to stimulus” as well as “cell surface receptor and cytokine signaling” (Figure 2B).

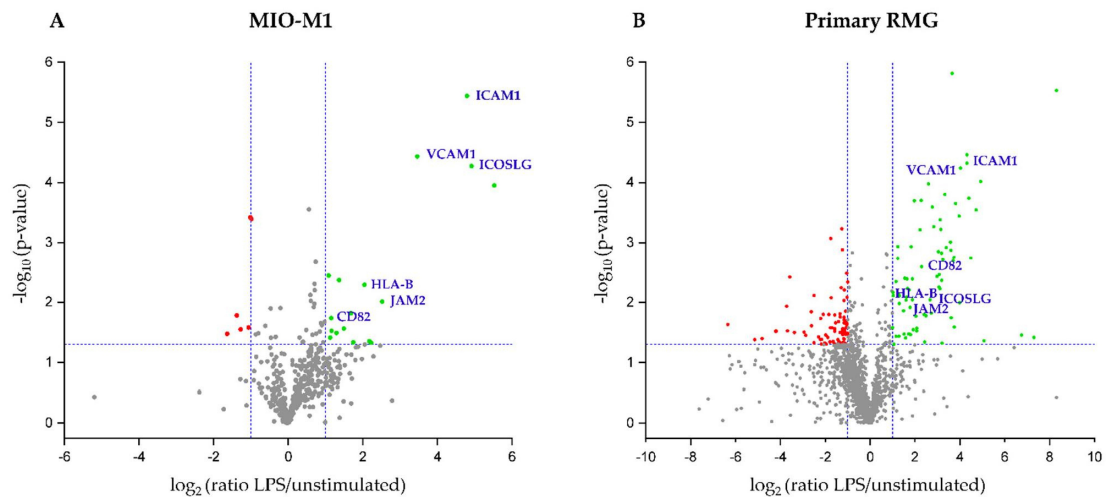


Figure 1. Volcano plot of all identified proteins in (A) MIO-M1 cells and (B) primary retinal Müller glial cells (RMG). (A) In MIO-M1 cells, 507 proteins were identified. Of those, 18 showed significantly (p -value ≤ 0.05) higher abundance (fold change ≥ 2 , green dots) after stimulation with LPS, while six proteins showed significantly lower abundance following LPS stimulation (fold change < 0.5 , red dots). (B) of all 1425 identified proteins in primary RMG, 79 identifications were significantly more abundant (green dots), whereas 82 proteins were significantly less abundant (red dots) after LPS stimulation. Dotted blue lines indicate cut-off values for p -value and ratio. Proteins that were more abundant after LPS in both primary RMG and MIO-M1 cells are labeled with their human orthologue gene name in blue.

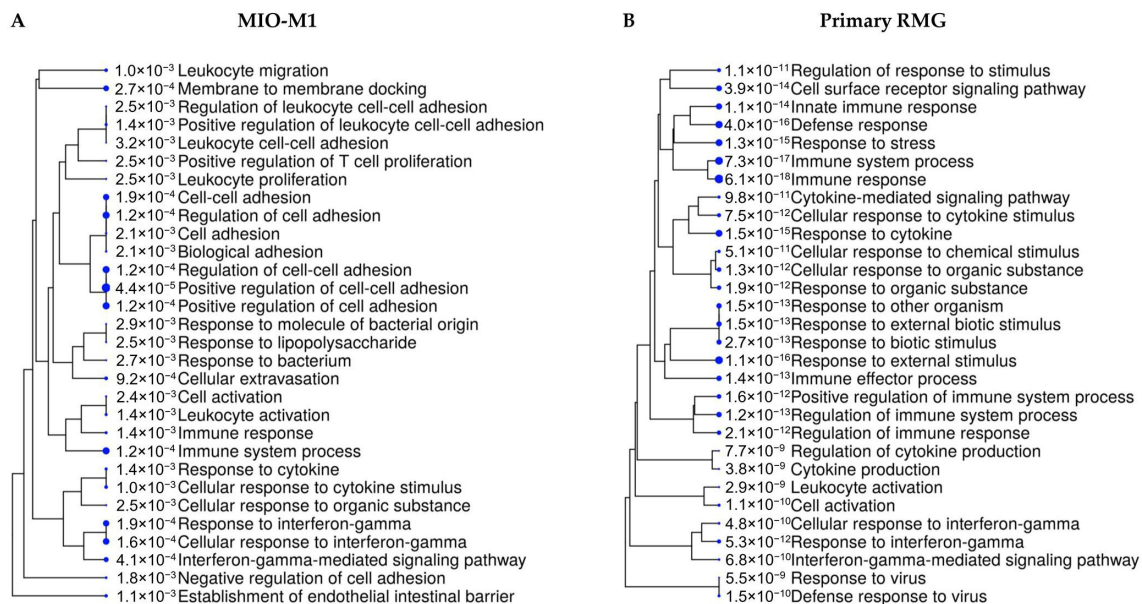


Figure 2. Shiny GO enrichment tree showing the 30 most significantly enriched functional categories from biological processes after LPS stimulation in (A) MIO-M1 cells and (B) primary RMG. Pathway enrichment analyses were performed with human orthologue gene names of proteins with significantly higher abundance in stimulated state. Size of the solid blue dots corresponds to the enrichment FDR with bigger dots indicating more significant p -values. Pathways with many shared genes are clustered together. Gene names of the proteins which clustered to respective pathways are given in Supplementary Table S3.

Furthermore, reactome pathway analysis confirmed associations with all three major subsets of the reactome super pathway immune system (“innate immune system”, “adaptive immune system” and “cytokine signaling in the immune system”) both for MIO-M1 cells and primary RMG (Figure 3). Overlap of enriched pathways between both cell types was especially pronounced among the adaptive immune system pathways. Proteins with higher abundance after stimulation in both cell types were allocated amongst others to the pathways “MHC class II antigen presentation”, “immunoregulatory interactions between a lymphoid and a non-lymphoid cell” and “co-stimulation by the CD28 family”, including “PD-1 signaling”, but also to “interleukin-4 and -13 and interferon signaling” (Figure 3A,B). Among the pathways which were enriched solely in proteins of primary cells, we detected “TCR signaling”, but also pathways of the innate immune system (“DDX58/IFIH1-mediated induction of interferon-alpha/beta”) and pathways belonging to the cytokine signaling system (“interleukin-6 and -10 signaling” as well as “ISG15 antiviral mechanism” and “OAS1 antiviral response”) (Figure 3B). There were no pathways exclusively overrepresented in the MIO-M1 cell line.

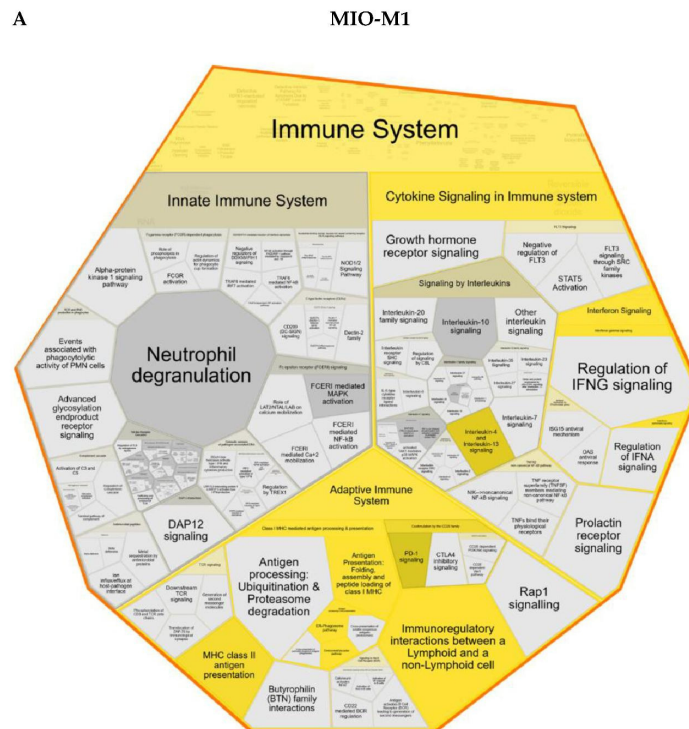


Figure 3. Cont.

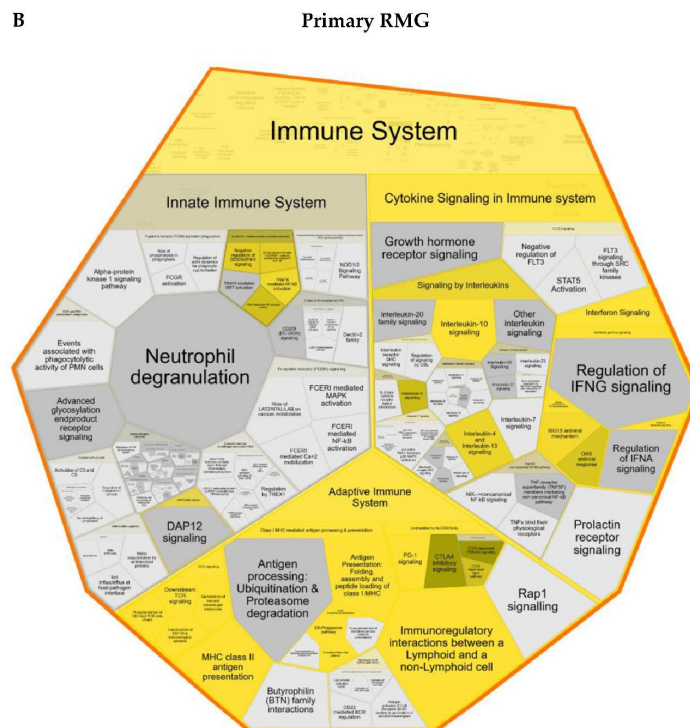


Figure 3. Voronoi diagram illustrating reactome analysis results comparing enriched pathways after LPS stimulation in (A) MIO-M1 cells and (B) primary retinal Müller glial cells (RMG). Enlarged polygon represents reactome superpathway immune system (for overview see Supplementary Figure S1 and Figure S2). Pathway enrichment analysis was calculated with human orthologue gene names of proteins with significantly higher abundance after LPS. Color intensity displays *p*-value of the statistical test for overrepresentation as illustrated by the color bar. Polygons colored in dark grey represent pathways without significant overrepresentation. Pathways without assigned proteins are displayed in light grey.

4. Discussion

The data we present here clearly demonstrate the capacity of RMG to respond to immune stimuli in a highly differentiated manner. We found that those RMG surface proteins which were more abundant after LPS stimulation clustered to all three major subsets of the reactome super pathway immune system with a focus on adaptive immunity and cytokine signaling, but also to cell adhesion processes. This is in line with a previous study, which showed that stimulation with LPS caused the nuclear translocation of NF κ B in primary RMG of C57BL/6J mice as well as cytokine release, and that media from LPS-stimulated RMG promoted leukocyte adhesion and endothelial migration [34]. Here, we provide a proteomic in-depth analysis of RMG surfaceome dynamics to *in vitro* LPS stimulation. With this hypothesis-generating approach, we were able to provide an unambiguous and much more detailed analysis of RMG surface proteins compared to antibody-based methods. Since our aim was to analyze and describe the reaction of the RMG surfaceome to nonspecific immune stimulation, we used prototype immune system stimulant LPS for our experiments. Our finding that cell-surface proteins of LPS-stimulated RMG clearly cluster to immune system pathways indicates an important role of RMG in general immune system processes and lays the basis for further investigations. Based on our proteomic dataset, further studies need to be carried out using various cytokines to gain more detailed insight in the reactive capacity of RMG. Since LPS represents a classical

danger signal for the immune system in various species [35–37], the reaction of Müller cells to this stimulatory signal might be of interest for further studies concerning gene therapies of ocular diseases. Genome editing causes unpredictable side effects due to the stimulation of an immune response by the delivery system for the genome editing vectors [38]. Thus, the capacity of Müller cells to actively participate in the immune response needs to be studied thoroughly in order to prevent unwanted side effects. In our analyses, we could demonstrate higher expression levels of OAS1 and ISG15 in primary RMG after LPS stimulation (Table 1) concomitant with the overrepresentation of the pathways “OAS1 antiviral response” and “ISG15 antiviral mechanism” (Figure 3B). This finding is of great interest, since ISG15 can function as an extracellular cytokine, interacting with various immune cells, such as natural killer cells, macrophages, dendritic cells and neutrophils, by modulating their function, but additionally, ISG15 is capable of inhibiting viral replication (reviewed in [39]). ISG15 expression is strongly induced by type I interferons, and its induction by LPS was also reported [40]. Thus, higher expression levels of ISG15 point to an activation of RMG after LPS stimulation.

To our knowledge, we were the first to perform mass spectrometric analysis on LPS-stimulated RMG surface proteins using both the spontaneously immortalized human RMG cell line MIO-M1 and primary cells. MIO-M1 cells have been shown to express known RMG markers such as cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) and GS. Furthermore, MIO-M1 cells depolarize upon glutamate treatment, indicating that the MIO-M1 cell line maintains the functional phenotype of RMG [29]. However, it is known that cell lines can change their phenotype over multiple passages and lose tissue-specific functions as they adapt to *in vitro* conditions [41]. In the case of MIO-M1, it has been observed that these cells express marker genes of neural progenitors as well as postmitotic neuronal cells and various opsins [42,43]. Thus, primary cells are often considered as more physiologically similar to *in vivo* cells [44]. Therefore, we also analyzed primary equine RMG. We previously demonstrated that cultured equine RMG express cell-specific proteins, such as GS and vimentin [30]. Thus, they represent a valuable model to study RMG functions *in vitro*. Our results revealed several proteins and pathways that were overrepresented after LPS stimulation in both MIO-M1 cells and primary RMG and, therefore, seem to represent a fundamental response pattern of RMG in retinal neuroinflammation. However, primary cells displayed a much more complex pathway and protein profile, which supports the importance of primary cells for studying the characteristics of RMG *in vivo*. For the preparation of primary RMG, we used equine retina, as control eyes from healthy horses are readily available, and retinal inflammation in the equine eye has proven to be a valuable model for glial involvement in neuroinflammation [19–21,45]. While interpreting our results, we must take into account that, in contrast to the vascularized human retina, the equine retina is almost completely avascular [46]. Except for a small area around the optic disc, the equine retina is devoid of both blood vessels and astrocytes [46,47]. Therefore, in contrast to human retinal tissue, RMG are the only macroglial cells in the equine retina [1]. In human retina, RMG contribute to the inner BRB, as they surround retinal blood vessels with their cell processes [7,48], whereas in horses, they are involved in the outer BRB, which separates the retina from the underlying pigment epithelium and choroidea [45,47]. This might account for some of the differences between MIO-M1 cells and equine RMG that we observed in this study. For instance, pathway enrichment analysis demonstrated cell-adhesion and migration processes as highly overrepresented, especially in MIO-M1 cells (Figure 3). This is an intriguing finding considering that human RMG cell processes closely surround retinal blood vessels and might, therefore, be implicated in the migration of cells into retinal tissue.

One main finding of this study was the expression of proteins, which are usually ascribed to APCs and are necessary for their interaction with T-cells, in RMG. MHC class I and II molecules were prominent among the proteins associated with antigen presentation and cell–cell interactions. “MHC class I antigen presentation” was overrepresented both in MIO-M1 cells and primary RMG after LPS stimulation (Figure 3), and MHC class I

molecules were more abundant after LPS stimulation in both cell types (Table 1), confirming the LPS-induced pro-inflammatory activation of RMG. Furthermore, in primary RMG, β -2-microglobulin (B2M), which represents another subunit of the MHC-complex, and Tap binding protein (TAPBP), which has an important function in peptide loading on MHC-I molecules [49], were significantly more abundant after stimulation (Table 1). Since MHC-I molecules are essential for antigen presentation to CD8 T-cells, which play a pivotal role in neuroinflammatory diseases [50–52], this finding merits further investigation from our point of view. In line with this, we demonstrated a higher abundance of MHC class II molecules in primary RMG but not in the MIO-M1 cell line after stimulation (Table 1). MHC class II molecules are primarily expressed by professional APCs, which process and present antigen to CD4 T-cells. In combination with co-stimulatory signals, this leads to T-cell activation [53]. In ocular inflammation, MHC class II-associated antigen presentation and T-cell activation were primarily ascribed to invading macrophages and resident microglia, but not to RMG [54,55]. However, the expression of MHC class II molecules in human RMG has been reported in a case of subretinal fibrosis and uveitis syndrome concomitant with T-helper-cell infiltration [18]. Furthermore, in equine recurrent uveitis, the expression of MHC class II molecules in RMG has been described within retinal glial scars, whereas the surrounding parts of the retina revealed no MHC class II expression [56]. The data we present here confirm the ability of RMG to express MHC class II molecules upon immune stimulation.

Moreover, we detected the pathways “immunoregulatory interactions between a lymphoid and a non-lymphoid cell” and “co-stimulation by the CD28 family”, as overrepresented pathways that are associated with interaction with T-cells (Figure 3). Among the proteins allocated to these pathways was ICOSLG, which was more abundant in both MIO-M1 cells and primary RMG (Table 1 and Figure 1). To our knowledge, ICOSLG expression has not been described in RMG before. Its higher expression in response to LPS stimulation is an interesting finding, since ICOSLG is primarily expressed on APCs, such as human monocyte derived dendritic cells [57], and its binding to ICOS serves as a co-stimulatory signal for activated T-cells in humans [57]. In a murine model of autoimmune uveitis, the *in vivo* blocking of ICOSLG signaling reduced disease severity and led to a smaller number of inflammatory infiltrates in the retina, suggesting that ICOS-ICOSLG interaction plays a critical role in uveitis pathogenesis [58]. Considering this, we propose that the induction of ICOSLG expression in RMG upon immune stimulation might play a critical role in the course of neuroinflammation, as it could lead to co-stimulatory signals for T-cells invading the retina. This result is complemented by the finding of a higher abundance of the tetraspanin CD82 in LPS-stimulated RMG (Table 1 and Figure 1). As far as we know, there are no data on CD82 expression and function in RMG to date. This tetraspanin, which is expressed in both APCs and T-cells, plays a role in T-cell co-stimulation by inducing an enhanced interaction between APCs and T-cells, especially during the early phase of activation [59]. This is carried out through a stronger interaction between integrin β 2 on T-cells and ICAM1 on APCs [60]. Thus, the elevated CD82 expression, which we detected in LPS-stimulated RMG, strengthens the hypothesis that RMG might act as atypical APCs that are able to interact with activated T-cells in the course of neuroinflammation in the retina. The implications of these interactions need to be addressed in future studies. Interestingly, we found that several other proteins which are involved in T-cell co-stimulation were also more abundant after LPS stimulation in primary RMG [61–63]. These include CD40 (Table 1), which has been described in RMG before [64,65], but also CD80 and CD86 (Table 1), whose ocular expression was associated with microglial cells [66] but not with RMG. Taken together, these results suggest the ability of RMG to interact with lymphocytes via different receptors and thus point to a pivotal role of these cells in T-cell mediated neuroinflammation. Therefore, further investigations concerning the role of respective proteins in inflammatory diseases of the eye need to be carried out.

Further proteins with higher abundance after LPS that belonged to the pathway “co-stimulation by the CD28 family” were programmed cell death 1 ligand 2 (PDCD1LG2) in

MIO-M1 cells and CD274 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) in primary RMG (Table 1). Similar to CD80 and CD86, these proteins belong to the B7 family. Since they bind to the immunoinhibitory receptor PD1 on activated human T-cells, they inhibit lymphocyte proliferation and cytokine secretion [67]. Thus, they are potent players in the maintenance of tolerance and the prevention of autoimmunity [68]. PD-L1 is primarily expressed on APCs [68], but it has also been detected in murine RMG [69], and its expression levels have been shown to be higher in inflamed ocular tissue [70]. Moreover, ocular cells increase the abundance of PD-L1 and PD-L2 after stimulation by IFN- γ [70], which is in line with our finding of higher expression levels of PD-L1 and PD-L2 after LPS stimulation in RMG. The upregulation of PD-ligands might represent a regulatory mechanism that counteracts inflammatory pathways. Thus, our findings reveal that, in addition to their proinflammatory role, RMG might also exert a protective function in neuroinflammation by resolving ocular immune responses and maintaining retinal homeostasis. Further investigations are required to elucidate the mechanisms of immunoregulation exerted by RMG.

Since little is known about the involvement of RMG in leukocyte migration to date, our finding that pathways such as “cell adhesion”, “cellular extravasation” and “leukocyte migration” were overrepresented in RMG after stimulation with LPS (Figure 2) is intriguing. Among the proteins allocated to these processes were ICAM1 and VCAM1 (Supplementary Table S3). Both proteins were more abundant in stimulated MIO-M1 cells as well as in stimulated primary RMG (Table 1 and Figure 1), which is in line with previous findings of increased ICAM1 expression after stimulation with LPS or IFN- γ in murine and rat Müller cells [71,72]. ICAM1 mediates the adhesion and migration of leukocytes through the endothelial barrier into inflamed tissue (reviewed in [73–75]), and it has been shown to regulate the migration of Th1- and Th17- T-cells through simulated human retinal endothelium [76]. High expression levels of these adhesion molecules have been reported in posterior uveitis in humans [77] and in murine EAU with VCAM1 expression in the perivascular extensions of RMG in uveitic murine eyes [78]. Moreover, the contribution of RMG to the regulation of leukocyte adhesion and migration has been proposed in a rat model of retinal diode laser photocoagulation, as ICAM1 was induced in RMG cell processes that surrounded the infiltrated CD4 T-cells and macrophages [79]. Thus, our result of significantly higher ICAM1 and VCAM1 expression levels in MIO-M1 cells and equine RMG after LPS stimulation point towards a regulatory role of RMG in leukocyte migration.

This is further supported by the finding of JAM2 (more often referred to as JAM-B, which will be used in the following) among the significantly more abundant proteins after LPS stimulation in both cell types (Table 1 and Figure 1). To our knowledge, we are the first to demonstrate that LPS-stimulated RMG express elevated levels of this adhesion molecule, which plays a role in leukocyte adhesion and migration [80]. At this point, it is noteworthy that the blockade of JAM-B in a murine model of CNS autoimmunity was accompanied by a partial protection against encephalomyelitis and a significant reduction in the number of infiltrating CD8 T-cells [81]. In this model, JAM-B was expressed in CNS endothelial cells and has been proposed as a ligand for the $\alpha 4\beta 1$ -integrin-mediated migration of CD8 T-cells into the CNS [81]. Taking this into account, we suggest that the higher expression levels of ICAM1, VCAM1 and JAM-B in activated RMG might render them capable of attracting and binding activated lymphocytes, thus contributing to lymphocyte homing into the inflamed retina. Since RMG are in close contact to retinal blood vessels in the human retina [7], this might represent a mechanism which enables lymphocytes to enter retinal tissue under inflammatory conditions.

5. Conclusions

In conclusion, our results provide a detailed description of the untreated and LPS-stimulated RMG surfaceome and strongly suggest an involvement of RMG in neuroinflammatory processes in the retina. The capacity to express proteins involved in antigen presentation and leukocyte migration might enable these glial cells to interact with invad-

ing lymphocytes, thus affecting the course of neuroinflammation. Since we used different cell types for our experiments, those candidates which were more abundant after LPS stimulation in both models might represent a common pathway in activated RMG. With our hypothesis-generating approach, we lay the basis for further investigations regarding the role of RMG in neuroinflammatory diseases.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/3/711/s1>, Figure S1: Reactome pathway analysis of significantly more abundant proteins in MIO-M1 cells after LPS stimulation; Figure S2: Reactome pathway analysis of significantly more abundant proteins in primary RMG after LPS stimulation; Table S1: All identified proteins of the MIO-M1 cell surfaceome; Table S2: All identified proteins of the primary RMG surfaceome; Table S3: Shiny GO enrichment analysis showing the most significantly enriched functional categories from biological processes after LPS stimulation in (1) MIO-M1 cells and (2) primary RMG including human orthologue gene names of proteins clustering to respective pathways.

Author Contributions: Conceptualization, S.M.H. and C.A.D.; Formal analysis, S.M.H.; Funding acquisition, S.M.H. and C.A.D.; Investigation, L.L., S.H., A.S., S.M.H. and C.A.D.; Project administration, C.A.D.; Supervision, C.A.D.; Visualization, L.L.; Writing—original draft, L.L. and C.A.D.; Writing—review and editing, S.M.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft in the SPP 2127, grant number DFG DE 719/7-1 to C.A.D., and HA 6014/5-1 to S.M.H.

Institutional Review Board Statement: No experimental animals were involved in this study. Collection and use of equine eyes from the abattoir were approved for purposes of scientific research by the appropriate board of the veterinary inspection office, Munich, Germany.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article or supplementary materials.

Acknowledgments: The authors would like to thank Nicole and Heinrich Veit for providing eye samples as well as Claudia Barfüßer, Roxane Degroote and Kristina Kleinwort for critical discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bringmann, A.; Pannicke, T.; Grosche, J.; Francke, M.; Wiedemann, P.; Skatchkov, S.N.; Osborne, N.N.; Reichenbach, A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin Eye Res.* **2006**, *25*, 397–424. [[CrossRef](#)]
2. Ghaseminejad, F.; Kaplan, L.; Pfaller, A.M.; Hauck, S.M.; Grosche, A. The role of Müller cell glucocorticoid signaling in diabetic retinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2020**, *258*, 221–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Li, X.; Liu, J.; Hoh, J.; Liu, J. Müller cells in pathological retinal angiogenesis. *Transl. Res.* **2019**, *207*, 96–106. [[CrossRef](#)]
4. Devoldere, J.; Peynshaert, K.; De Smedt, S.C.; Remaut, K. Müller cells as a target for retinal therapy. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1483–1498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Reichenbach, A.; Bringmann, A. Glia of the human retina. *Glia* **2020**, *68*, 768–796. [[CrossRef](#)]
6. Müller, H. Zur histologie der netzhaut. *Z. Wiss. Zool.* **1851**, *3*, 234–237.
7. Newman, E.; Reichenbach, A. The Müller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 307–312. [[CrossRef](#)]
8. Bringmann, A.; Reichenbach, A.; Wiedemann, P. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res.* **2004**, *36*, 241–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tout, S.; Chan-Ling, T.; Holländer, H.; Stone, J. The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* **1993**, *55*, 291–301. [[CrossRef](#)]
10. Matsui, K.; Hosoi, N.; Tachibana, M. Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 6755–6766. [[CrossRef](#)]
11. Poitry-Yamate, C.L.; Poitry, S.; Tsacopoulos, M. Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 5179–5191. [[CrossRef](#)]
12. Tsacopoulos, M.; Magistretti, P.J. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 877–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bringmann, A.; Iandiev, I.; Pannicke, T.; Wurm, A.; Hollborn, M.; Wiedemann, P.; Osborne, N.N.; Reichenbach, A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Prog. Retin Eye Res.* **2009**, *28*, 423–451. [[CrossRef](#)]

14. Liberto, C.M.; Albrecht, P.J.; Herx, L.M.; Yong, V.W.; Levison, S.W. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* **2004**, *89*, 1092–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Roberge, F.G.; Caspi, R.R.; Nussenblatt, R.B. Glial retinal Müller cells produce IL-1 activity and have a dual effect on autoimmune T helper lymphocytes. Antigen presentation manifested after removal of suppressive activity. *J. Immunol.* **1988**, *140*, 2193–2196. [[PubMed](#)]
16. Eastlake, K.; Banerjee, P.J.; Angbohang, A.; Charteris, D.G.; Khaw, P.T.; Limb, G.A. Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia* **2016**, *64*, 495–506. [[CrossRef](#)]
17. Natoli, R.; Fernando, N.; Madigan, M.; Chu-Tan, J.A.; Valter, K.; Provis, J.; Rutar, M. Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kim, M.K.; Chan, C.C.; Belfort, R., Jr.; Farah, M.; Burnier, M.P.; Nussenblatt, R.B.; Kuwabara, T.; Palestine, A.G. Histopathologic and immunohistopathologic features of subretinal fibrosis and uveitis syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **1987**, *104*, 15–23. [[CrossRef](#)]
19. Hauck, S.M.; Schoeffmann, S.; Amann, B.; Stangassinger, M.; Gerhards, H.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Retinal Müller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2121–2131. [[CrossRef](#)]
20. Eberhardt, C.; Amann, B.; Feuchtinger, A.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Müller glial cell-dependent ion and water homeostasis. *Glia* **2011**, *59*, 697–707. [[CrossRef](#)]
21. Deeg, C.A.; Amann, B.; Lutz, K.; Hirmer, S.; Lutterberg, K.; Kremmer, E.; Hauck, S.M. Aquaporin 11, a regulator of water efflux at retinal Müller glial cell surface decreases concomitant with immune-mediated gliosis. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 89. [[CrossRef](#)]
22. Lorenz, L.; Amann, B.; Hirmer, S.; Degroote, R.L.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells. *Glycobiology* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bachmann, M.; Kukkurainen, S.; Hytönen, V.P.; Wehrle-Haller, B. Cell Adhesion by Integrins. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1655–1699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gaud, G.; Lesourne, R.; Love, P.E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 485–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sweeney, M.D.; Zhao, Z.; Montagne, A.; Nelson, A.R.; Zlokovic, B.V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 21–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wu, C.C.; Yates, J.R. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 262–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Jeremiassi, B.; Matta, C.; Fellows, C.R.; Boockch, D.J.; Smith, J.R.; Liddell, S.; Lafeber, F.; van Spil, W.E.; Mobasheri, A. Alterations in the chondrocyte surfaceome in response to pro-inflammatory cytokines. *BMC Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 47. [[CrossRef](#)]
28. Uhl, P.B.; Sober, C.M.; Amann, B.; Alge-Priglinger, C.; Ueffing, M.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis. *J. Proteom.* **2014**, *109*, 50–62. [[CrossRef](#)]
29. Limb, G.A.; Salt, T.E.; Munro, P.M.; Moss, S.E.; Khaw, P.T. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 864–869. [[PubMed](#)]
30. Eberhardt, C.; Amann, B.; Stangassinger, M.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. Isolation, characterization and establishment of an equine retinal glial cell line: A prerequisite to investigate the physiological function of Müller cells in the retina. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* **2012**, *96*, 260–269. [[CrossRef](#)]
31. Hauck, S.M.; Suppmann, S.; Ueffing, M. Proteomic profiling of primary retinal Müller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. *Glia* **2003**, *44*, 251–263. [[CrossRef](#)]
32. Hauck, S.M.; Hofmaier, F.; Dietter, J.; Swadzba, M.E.; Blindert, M.; Amann, B.; Behler, J.; Kremmer, E.; Ueffing, M.; Deeg, C.A. Label-free LC-MS/MS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 4545–4554. [[CrossRef](#)]
33. Hauck, S.M.; Dietter, J.; Kramer, R.L.; Hofmaier, F.; Zipplies, J.K.; Amann, B.; Feuchtinger, A.; Deeg, C.A.; Ueffing, M. Deciphering Membrane-Associated Molecular Processes in Target Tissue of Autoimmune Uveitis by Label-Free Quantitative Mass Spectrometry. *Mol. Cell Proteom.* **2010**, *9*, 2292–2305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shanmugam, A.; Wang, J.; Markand, S.; Perry, R.L.; Tawfik, A.; Zorrilla, E.; Ganapathy, V.; Smith, S.B. Sigma receptor 1 activation attenuates release of inflammatory cytokines MIP1 γ , MIP2, MIP3 α , and IL12 (p40/p70) by retinal Müller glial cells. *J. Neurochem.* **2015**, *132*, 546–558. [[CrossRef](#)]
35. Iwami, K.-I.; Matsuguchi, T.; Masuda, A.; Kikuchi, T.; Musikacharoen, T.; Yoshikai, Y. Cutting Edge: Naturally Occurring Soluble Form of Mouse Toll-Like Receptor 4 Inhibits Lipopolysaccharide Signaling. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 6682–6686. [[CrossRef](#)]
36. Beutler, B.; Rietschel, E.T. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 169–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pacholewska, A.; Marti, E.; Leeb, T.; Jagannathan, V.; Gerber, V. LPS-induced modules of co-expressed genes in equine peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Chew, W.L.; Tabebordbar, M.; Cheng, J.K.W.; Mali, P.; Wu, E.Y.; Ng, A.H.M.; Zhu, K.; Wagers, A.J.; Church, G.M. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 868–874. [[CrossRef](#)]
39. Perng, Y.-C.; Lenschow, D.J. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 423–439. [[CrossRef](#)]

40. Malakhova, O.; Malakhov, M.; Hetherington, C.; Zhang, D.E. Lipopolysaccharide activates the expression of ISG15-specific protease UBP43 via interferon regulatory factor 3. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14703–14711. [[CrossRef](#)]
41. Pan, C.; Kumar, C.; Bohl, S.; Klingmueller, U.; Mann, M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol. Cell Proteom.* **2009**, *8*, 443–450. [[CrossRef](#)]
42. Hollborn, M.; Ulbricht, E.; Rillich, K.; Dukic-Stefanovic, S.; Wurm, A.; Wagner, L.; Reichenbach, A.; Wiedemann, P.; Limb, G.A.; Bringmann, A.; et al. The human Müller cell line MIO-M1 expresses opsins. *Mol. Vis.* **2011**, *17*, 2738–2750. [[PubMed](#)]
43. Lawrence, J.M.; Singhal, S.; Bhatia, B.; Keegan, D.J.; Reh, T.A.; Luthert, P.J.; Khaw, P.T.; Limb, G.A. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells* **2007**, *25*, 2033–2043. [[CrossRef](#)]
44. Pereiro, X.; Ruzafa, N.; Acera, A.; Urcola, A.; Vecino, E. Optimization of a Method to Isolate and Culture Adult Porcine, Rats and Mice Müller Glia in Order to Study Retinal Diseases. *Front. Cell Neurosci* **2020**, *14*, 7. [[CrossRef](#)]
45. Deeg, C.A.; Eberhardt, C.; Hofmaier, F.; Amann, B.; Hauck, S.M. Osteopontin and fibronectin levels are decreased in vitreous of autoimmune uveitis and retinal expression of both proteins indicates ECM re-modeling. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Schnitzer, J. Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: Their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia* **1988**, *1*, 74–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ehrenhofer, M.C.A.; Deeg, C.A.; Reese, S.; Liebich, H.-G.; Stangassinger, M.; Kaspers, B. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet. Ophthalmol.* **2002**, *5*, 39–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Reichenbach, A.; Wurm, A.; Pannicke, T.; Iandiev, I.; Wiedemann, P.; Bringmann, A. Müller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2007**, *245*, 627–636. [[CrossRef](#)]
49. Bles, A.; Janulienė, D.; Hofmann, T.; Koller, N.; Schmidt, C.; Trowitzsch, S.; Moeller, A.; Tampé, R. Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature* **2017**, *551*, 525–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Gross, C.C.; Meyer, C.; Bhatia, U.; Yshii, L.; Kleffner, I.; Bauer, J.; Tröschler, A.R.; Schulte-Mecklenbeck, A.; Herich, S.; Schneider-Hohendorf, T.; et al. CD8+ T cell-mediated endotheliopathy is a targetable mechanism of neuro-inflammation in Susac syndrome. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Unger, M.S.; Li, E.; Scharnagl, L.; Poupardin, R.; Altendorfer, B.; Mrowetz, H.; Hutter-Paier, B.; Weiger, T.M.; Heneka, M.T.; Attems, J.; et al. CD8(+) T-cells infiltrate Alzheimer’s disease brains and regulate neuronal- and synapse-related gene expression in APP-PS1 transgenic mice. *Brain Behav. Immun.* **2020**, *89*, 67–86. [[CrossRef](#)]
52. Zhao, Y.; Qiu, W.; Liu, J.; Yuan, X.; Mao, W.; Yin, J.; Peng, B.; Liu, W.; Han, S.; He, X. Blockade of Kv1.3 potassium channel inhibits CD8(+) T cell-mediated neuroinflammation via PD-1/Blimp-1 signaling. *FASEB J.* **2020**, *34*, 15492–15503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Guerder, S.; Flavell, R.A. T-cell activation. Two for T. *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 866–868. [[CrossRef](#)]
54. Lipski, D.A.; Dewispelaere, R.; Foucart, V.; Caspers, L.E.; Defrance, M.; Bruyns, C.; Willermain, F. MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 136. [[CrossRef](#)]
55. Zhang, J.; Wu, G.S.; Ishimoto, S.; Pararajasegaram, G.; Rao, N.A. Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. Immunohistochemical study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1997**, *38*, 1848–1857. [[PubMed](#)]
56. Romeike, A.; Brüggmann, M.; Drommer, W. Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet. Pathol.* **1998**, *35*, 515–526. [[CrossRef](#)]
57. Aicher, A.; Hayden-Ledbetter, M.; Brady, W.A.; Pezzutto, A.; Richter, G.; Magaletti, D.; Buckwalter, S.; Ledbetter, J.A.; Clark, E.A. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 4689–4696. [[CrossRef](#)]
58. Usui, Y.; Akiba, H.; Takeuchi, M.; Kezuka, T.; Takeuchi, A.; Hattori, T.; Okunuki, Y.; Yamazaki, T.; Yagita, H.; Usui, M.; et al. The role of the ICOS/B7RP-1 T cell costimulatory pathway in murine experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 3071–3081. [[CrossRef](#)]
59. Shibagaki, N.; Hanada, K.; Yamaguchi, S.; Yamashita, H.; Shimada, S.; Hamada, H. Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: Roles in cell adhesion and signal transduction. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 1125–1133. [[CrossRef](#)]
60. Shibagaki, N.; Hanada, K.; Yamashita, H.; Shimada, S.; Hamada, H. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1/ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: Functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 4081–4091. [[CrossRef](#)]
61. Chen, L.; Flies, D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 227–242. [[CrossRef](#)]
62. Karnell, J.L.; Rieder, S.A.; Ettinger, R.; Kolbeck, R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *141*, 92–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kelsall, B.L.; Stüber, E.; Neurath, M.; Strober, W. Interleukin-12 Production by Dendritic Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *795*, 116–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Portillo, J.A.; Okenka, G.; Kern, T.S.; Subauste, C.S. Identification of primary retinal cells and ex vivo detection of proinflammatory molecules using flow cytometry. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 1383–1389.
65. Portillo, J.A.; Greene, J.A.; Okenka, G.; Miao, Y.; Sheibani, N.; Kern, T.S.; Subauste, C.S. CD40 promotes the development of early diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia* **2014**, *57*, 2222–2231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Louveau, A.; Nerrière-Daguin, V.; Vanhove, B.; Naveilhan, P.; Neunlist, M.; Nicot, A.; Boudin, H. Targeting the CD80/CD86 costimulatory pathway with CTLA4-Ig directs microglia toward a repair phenotype and promotes axonal outgrowth. *Glia* **2015**, *63*, 2298–2312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Freeman, G.J.; Long, A.J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L.J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M.C.; et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1027–1034. [[CrossRef](#)]
68. Keir, M.E.; Butte, M.J.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, *26*, 677–704. [[CrossRef](#)]
69. Sham, C.W.; Chan, A.M.; Kwong, J.M.K.; Caprioli, J.; Nusinowitz, S.; Chen, B.; Lee, J.G.; Gandhi, N.M.; Francisco, L.M.; Sharpe, A.H.; et al. Neuronal Programmed Cell Death-1 Ligand Expression Regulates Retinal Ganglion Cell Number in Neonatal and Adult Mice. *J. Neuroophthalmol.* **2012**, *32*, 227–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Yang, W.; Li, H.; Chen, P.W.; Alizadeh, H.; He, Y.; Hogan, R.N.; Niederkorn, J.Y. PD-L1 Expression on Human Ocular Cells and Its Possible Role in Regulating Immune-Mediated Ocular Inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50*, 273–280. [[CrossRef](#)]
71. Drescher, K.M.; Whittum-Hudson, J.A. Modulation of immune-associated surface markers and cytokine production by murine retinal glial cells. *J. Neuroimmunol.* **1996**, *64*, 71–81. [[CrossRef](#)]
72. Gu, R.; Ding, X.; Tang, W.; Lei, B.; Jiang, C.; Xu, G. A Synthesized Glucocorticoid- Induced Leucine Zipper Peptide Inhibits Retinal Müller Cell Gliosis. *Front. Pharm.* **2018**, *9*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Marchetti, L.; Engelhardt, B. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. *VASC Biol.* **2020**, *2*, H1–h18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678–689. [[CrossRef](#)]
75. Bui, T.M.; Wiesolek, H.L.; Sumagin, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *108*, 787–799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Bharadwaj, A.S.; Schewitz-Bowers, L.P.; Wei, L.; Lee, R.W.J.; Smith, J.R. Intercellular Adhesion Molecule 1 Mediates Migration of Th1 and Th17 Cells Across Human Retinal Vascular Endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 6917–6925. [[CrossRef](#)]
77. Whitcup, S.M.; Chan, C.-C.; Li, Q.; Nussenblatt, R.B. Expression of Cell Adhesion Molecules in Posterior Uveitis. *Arch. Ophthalmol.* **1992**, *110*, 662–666. [[CrossRef](#)]
78. Dewispelaere, R.; Lipski, D.; Foucart, V.; Bruyns, C.; Frère, A.; Caspers, L.; Willermain, F. ICAM-1 and VCAM-1 are differentially expressed on blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis. *Exp. Eye Res.* **2015**, *137*, 94–102. [[CrossRef](#)]
79. Richardson, P.R.; Boulton, M.E.; Duvall-Young, J.; McLeod, D. Immunocytochemical study of retinal diode laser photocoagulation in the rat. *Br. J. Ophthalmol.* **1996**, *80*, 1092–1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Weber, C.; Fraemohs, L.; Dejana, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 467–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Martin-Blondel, G.; Pignolet, B.; Tietz, S.; Yshii, L.; Gebauer, C.; Perinat, T.; Van Weddingen, I.; Blatti, C.; Engelhardt, B.; Liblau, R. Migration of encephalitogenic CD8 T cells into the central nervous system is dependent on the $\alpha 4\beta 1$ -integrin. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 3302–3312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5 DISKUSSION

Bereits im Jahr 1858 bezeichnete Rudolf Virchow in seinen Vorlesungen zur *Cellularpathologie* die Entdeckung Heinrich Müllers, dass „radiäre Fasern“ die Retina in ihrer ganzen Breite durchziehen, als „eine[n] der wichtigsten Schritte“, um „das Verhältniss aller ihrer einzelnen Theile mit Sicherheit zu ermitteln“ (Virchow 1859). Welche wichtige Funktion Müllerzellen nicht nur für den anatomischen Aufbau der Retina, sondern auch für die Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase und somit für die Bewahrung des Visus haben, wurde durch zahlreiche Studien der letzten Jahre und Jahrzehnte belegt (Reichenbach und Bringmann 2013, Reichenbach und Bringmann 2020). Bereits in den 1980er Jahren wurden zudem Hinweise für eine immunologische Funktion der Müllerzellen gefunden (Roberge et al. 1988), die in aktuelleren Studien bestätigt und erweitert werden konnten (Kumar und Shamsuddin 2012, Singh et al. 2014, Natoli et al. 2017, Heng et al. 2019, Rezzola et al. 2021). Dennoch ist die Rolle der Müllerzellen im retinalen Entzündungsgeschehen bis heute unzureichend geklärt. Ziel dieser Studie war es daher, die Reaktion von Müllerzellen auf ein inflammatorisches Milieu näher zu charakterisieren und somit einen Einblick in ihre Beteiligung an der retinalen Inflammation und an der Pathogenese der ERU zu erhalten. Die ERU stellt in der Praxis eine häufige entzündliche Erkrankung der intraokulären Strukturen dar, mit gravierenden Folgen sowohl für die betroffenen Pferde als auch für deren Halter (Gerding und Gilger 2016). In einer amerikanischen Studie wurde dargelegt, dass es in fast der Hälfte der untersuchten Augen trotz adäquater Behandlung zur Erblindung kam, wobei knapp 30% der Pferde beidseitig erblindeten (Gerding und Gilger 2016). Dies verdeutlicht die veterinärmedizinische Relevanz dieser Erkrankung und die Notwendigkeit, Pathogenese-assoziierte Mechanismen aufzuklären. Sowohl in einem Nagermodell für die humane autoimmune Uveitis, als auch im Rahmen der ERU konnte eine Aktivierung der Müllerzellen gezeigt werden (Hauck et al. 2007, Eberhardt et al. 2011, Deeg et al. 2016, Heng et al. 2019). Um die Beteiligung der Müllerzellen an der retinalen Immunantwort im Allgemeinen, aber auch speziell im Rahmen der ERU zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Modelle verwendet. Zum einen führten wir immunhistologische Untersuchungen von Netzhaut-Schnitten gesunder und an ERU erkrankter Pferde durch, um Erkenntnisse bezüglich der Beteiligung von Müllerzellen an der Uveitis-

Pathogenese zu gewinnen (Publikation I). Zum anderen lieferte die differenzielle Proteomanalyse primärer equiner Müllerzellen (eqMZ) und der Zellen einer humanen Müllerzelllinie nach *in-vitro*-Stimulation mit LPS einen Überblick über die Reaktion von Müllerzellen auf einen inflammatorischen Stimulus (Publikation II). Diese beiden unterschiedlichen Ansätze ermöglichten uns, die Müllerzelle in verschiedenen Milieus und mit unterschiedlichen Methoden zu charakterisieren. Die Immunhistologie stellt hierbei eine geeignete Methode dar, da die Müllerzelle im retinalen Zellverband verbleibt und bei der mikroskopischen Untersuchung der Netzhaut zwischen den einzelnen Zellen und Schichten unterschieden werden kann. Mithilfe der Immunhistologie konnten wir die höhere Abundanz von Neuraminidase 1 (NEU1) in uveitischen Müllerzellen bestätigen, die bei der LC-MS/MS-Analyse von Müllerzellen gesunder Kontrolltiere und eines an ERU erkrankten Pferdes aufgefallen war (Tab. 1, Fig. 1, Fig. 3, Publikation I). Zudem zeigten unsere immunhistologischen Untersuchungen, dass uveitische Netzhäute weniger terminale Sialinsäuren aufwiesen als die Netzhäute gesunder Kontrolltiere (Fig. 4, Fig. 5, Publikation I). Hierbei gilt es zu bedenken, dass die in dieser Studie verwendeten histologischen Präparate von Pferden unterschiedlicher Rassen, unterschiedlichen Alters und Geschlechts sowie in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung stammen. Dieser Umstand erschwert zwar den direkten Vergleich eines bestimmten Parameters, andererseits erlaubt er aber einen Einblick in die unterschiedlichen Stadien retinaler Entzündung und Degeneration und bildet somit die Realität der Erkrankung originalgetreuer ab als dies beispielsweise bei verschiedenen induzierten Nagermodellen der Fall ist. Die immunhistologische Untersuchung der Retina, des Zielorgans der autoreaktiven T-Zellen, hat sich daher bereits in vielen Studien zur ERU als wertvoll erwiesen (Deeg et al. 2002a, Eberhardt et al. 2011, Deeg et al. 2016, Kleinwort et al. 2016).

Die vermehrte Expression von NEU1, die wir in uveitischen Netzhäuten zeigen konnten, wurde bereits in diversen, sehr unterschiedlichen Kontexten als pro-inflammatorisch diskutiert: In einem Mäusemodell für systemischen Lupus erythematodes beispielsweise war die vermehrte Aktivität von NEU1 assoziiert mit der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, GM-CSF und MIP-1 α durch die Zellen des Mesangiums, die als Immunzellen der Niere gelten (Sundararaj et al. 2021). Ein ähnliches Phänomen konnte in einem Modell für Obesitas festgestellt werden, in dem Zellen einer murinen Adipozyten-Zelllinie mit LPS stimuliert wurden

(Natori et al. 2017). Ein Knockdown von NEU1 durch siRNA führte in diesem Modell zu einer signifikanten Hemmung der Sekretion von IL-6 und MCP-1 nach LPS-Stimulation (Natori et al. 2017). Auch im Auge wurde die vermehrte Aktivität von NEU1 mit einer verstärkten Immunantwort in Zusammenhang gebracht (Allendorf et al. 2020a, Allendorf et al. 2020b). Die Aktivierung einer murinen Mikroglia-Zelllinie durch LPS führte dabei zu einer vermehrten Expression und auch Aktivität von NEU1 auf der Zelloberfläche der Mikrogliazellen und zur Desialylierung des Toll-like-Rezeptors TLR-4 (Allendorf et al. 2020a). Dies verstärkte die durch die aktivierten Mikroglia hervorgerufene Entzündungsreaktion und führte zu vermehrter Phagozytose von Neuronen (Allendorf et al. 2020b). In Müllerzellen wurde die Expression und Rolle von NEU1 jedoch unseres Wissens bis dato nicht beschrieben (PubMed-Recherche Stand August 2021). Die vorliegende Arbeit liefert daher nicht nur neue Erkenntnisse bezüglich der Expression von NEU1 in equiner Retina, sondern stellt zudem zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen vermehrter Expression von NEU1 in Müllerzellen und retinaler Inflammation her. NEU1 könnte somit einen neuen Biomarker für aktivierte Müllerzellen darstellen. Im Zellmembranproteom von mit LPS stimulierten Müllerzellen, das im Rahmen dieser Studie anhand von LC-MS/MS generiert wurde, konnte NEU1 allerdings nicht identifiziert werden (Supplementary Table 1, Suppl. Tab. 2, Publikation II). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass NEU1 vorwiegend intrazellulär in den Lysosomen vorliegt (Bonten et al. 1996) und somit in unserer massenspektrometrischen Analyse des Membranproteoms nicht vorhanden war. Allerdings wird NEU1 bei der Aktivierung von Zellen meist aus dem Zellinneren an die Oberfläche transportiert, wo es seine enzymatische Aktivität entfaltet (Amith et al. 2010, Allendorf et al. 2020a). Möglicherweise wurde auch an der Zelloberfläche exprimiertes NEU1 anhand des gewählten Aminoxy-Biotinylierungs-Ansatzes nicht entsprechend angereichert und isoliert, sodass es in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse nicht identifiziert werden konnte. Die proteomische Analyse eines vollständigen Zell-Lysates oder eine immunzytologische Färbung stimulierter Müllerzellen könnte Aufschluss geben über die Expression und Lokalisation von NEU1 in durch LPS aktivierten Müllerzellen. Zudem sollte die Expression nach der Stimulation mit Zytokinen wie IFN- γ oder verschiedenen Interleukinen untersucht werden.

Da NEU1 die Abspaltung von Sialinsäuren von den darunterliegenden Glykoproteinen katalysiert (Bonten et al. 1996), untersuchten wir im nächsten Schritt, ob und inwiefern zwischen gesunder und uveitischer Netzhaut ein Unterschied bezüglich der terminalen Sialinsäuren besteht. Dies testeten wir anhand von immunhistologischen Färbungen mit Sialinsäure-spezifischen Lektinen. Dabei konnte eine deutlich verminderte Bindung von Maackia Amurensis Leukoagglutinin (MAL), Maackia Amurensis Hämagglutinin (MAH) und Sambucus Nigra Lektin (SNA) gezeigt werden (Fig. 4, Fig. 5, Publikation I), wobei MAL und MAH vorwiegend an α 2-3- und SNA an α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren binden (Tab. II, Publikation I). Als Kontrolle wurde Wheat Germ Agglutinin (WGA) verwendet, das in erster Linie an N-Acetylglucosamin bindet (Tab. II, Publikation I). WGA zeigte sowohl in gesunder als auch uveitischer Retina eine starke Bindungskapazität (Fig. 4, Fig. 5, Publikation I). Basierend auf diesen Ergebnissen entwickelten wir die Hypothese, dass vermehrte NEU1-Expression in uveitischen Müllerzellen verantwortlich sein könnte für die Abspaltung von Sialinsäuren im entzündeten retinalen Gewebe. Da die Desialylierung von Zellen häufig im Zusammenhang mit der Aktivierung von Immunzellen sowie einer pro-inflammatorischen Reaktion steht (Wang et al. 2016, Puigdellívol et al. 2020, Karmakar und Mandal 2021, Klaus et al. 2021), legen unsere Ergebnisse zudem nahe, dass die vermehrte Expression von NEU1 in uveitischen Müllerzellen und die damit einhergehende Desialylierung des retinalen Gewebes die retinale Inflammation verstärkt. Dieser Zusammenhang wurde beispielsweise in einer aktuellen Studie an synovialen Fibroblasten (SFs) gezeigt (Wang et al. 2021b). SFs, die als Hauptbestandteil der Synovialis die Innenseite von Gelenken auskleiden und im physiologischen Zustand zur Aufrechterhaltung der Homöostase beitragen, reagieren im Rahmen von Rheumatoider Arthritis auf pro-inflammatorische Zytokine und übernehmen eine zentrale immunpathologische Rolle, was letztlich zu arthritischen Schäden des Gewebes führt (Bottini und Firestein 2013). In einer aktuellen Studie konnte demonstriert werden, dass die Umwandlung von SFs in einen pro-inflammatorischen Phänotyp im Rahmen von experimentell ausgelöster Arthritis in Mäusen mit einer Verminderung der terminalen Sialinsäuren einherging (Wang et al. 2021b). Dabei führte alleine die enzymatische Abspaltung der Sialinsäuren bereits zu einer pro-inflammatorischen Reaktion der SFs (Wang et al. 2021b). Auch Müllerzellen unterliegen im Rahmen der ERU einer phänotypischen Veränderung.

Aktivierte uveitische Müllerzellen können aufgrund der verminderten Expression von Proteinen wie GS, Kir4.1 oder AQP5 und AQP11 die retinale Homöostase nicht mehr adäquat aufrechterhalten, exprimieren aber unter anderem IFN- γ und tragen somit zur retinalen Inflammation bei (Hauck et al. 2007, Eberhardt et al. 2011, Deeg et al. 2016). Ähnlich wie bei den SFs gezeigt, könnte auch in Müllerzellen ein Zusammenhang bestehen zwischen der Desialylierung und dem phänotypischen Wandel von einer Zelle, deren Funktion die Aufrechterhaltung der Homöostase ist, hin zu einer pro-inflammatorischen Zelle, die selbst IFN- γ produziert. Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen, wird zunächst geklärt werden müssen, ob die vermehrte Expression von NEU1 in uveitischen Müllerzellen tatsächlich mit vermehrter Sialidase-Aktivität einhergeht. Da neben NEU1 weitere Sialidasen bekannt sind (Miyagi und Yamaguchi 2012), sollte zudem untersucht werden, inwiefern diese am Krankheitsgeschehen beteiligt sind. In unserer massenspektrometrischen Analyse uveitischer Müllerzellen wurde lediglich NEU1 identifiziert, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass andere retinale Zellen Sialidasen oder auch Sialyltransferasen exprimieren und somit beteiligt sind an der (De)sialylierung retinaler Zellen. Weiterführende Studien sollten dann ebenfalls prüfen, ob die vermehrte Sialidase-Aktivität beispielsweise in erhöhter Zytokin-Produktion durch Müllerzellen resultiert. Die mangelnde Verfügbarkeit von Augen an ERU erkrankter Pferde stellt hierbei wohl die größte Hürde dar. Retinale Explantate gesunder Kontrolltiere könnten hier eine Möglichkeit darstellen, auch ohne uveitische Augen einen Einblick in die geschilderten Zusammenhänge zu erlangen. Diese Explantate - auch als organotypische Netzhautkulturen bezeichnet - stellen in der ophtalmologischen Forschung eine häufig genutzte Alternative zur Kultur primärer Zellen dar, da in diesem Fall das Netzwerk aus neuronalen Zellen und Gliazellen erhalten bleibt und die *in-vivo*-Situation somit besser abgebildet wird als das bei einzeln isolierten kultivierten Zellen der Fall ist (Schnichels et al. 2021). Dazu werden aus der Retina bestimmte Bereiche beispielsweise mit einer Biopsiestanze entnommen und in Kultur verbracht (Sagmeister et al. 2021). Eine Limitation der organotypischen Kultur besteht allerdings darin, dass die Axotomie in jedem Fall Neurodegeneration und Gliose hervorruft und die Explantate somit nur für eine begrenzte Zeit vital bleiben (Alarautalahti et al. 2019). In unserem Fall könnten künftig retinale Explantate gesunder Kontrolltiere mit aktiver Neuraminidase behandelt werden, um im Anschluss immunhistologisch den Gehalt

an terminalen Sialinsäuren sowie anhand von ELISAs die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine im Zellkulturmedium zu messen. Zusätzlich wäre zu untersuchen, ob die Stimulation der Retina eine durch NEU1-Aktivität bedingte Abspaltung von Sialinsäuren hervorruft. Dabei könnte die Stimulation der Explantate zum einen durch pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ vorgenommen werden, zum anderen könnte sie durch Kokultur mit T-Zellen von an ERU erkrankten Pferden erfolgen. Da im Falle eines Uveitis-Schubs aktivierte T-Zellen die BRS überqueren und massive retinale Entzündungsreaktionen auslösen (Gilger et al. 1999, Kleinwort et al. 2016), bildet die Koinkubation der retinalen Explantate mit aktivierten Entzündungszellen die *in-vivo*-Situation besser ab als die Stimulation mit Zytokinen. Schließlich könnte eine Hemmung der Sialidase-Aktivität beispielsweise durch siRNA zeigen, ob die beobachteten Phänomene tatsächlich durch NEU1-Aktivität verursacht sind. Unseres Wissens sind organotypische Kulturen aus der Retina des Pferdes aktuell noch nicht etabliert (PubMed-Recherche Stand August 2021), sodass für den geschilderten Ansatz zunächst die Entwicklung eines geeigneten Protokolls vonnöten wäre.

Neben den immunhistologischen Untersuchungen führten wir zudem eine LC-MS/MS-Analyse primärer Müllerzellen durch. Dafür wurden equine Müllerzellen aus der frischen Retina gesunder Kontrolltiere isoliert und kultiviert. Zudem wurden Zellen der humanen Müllerzelllinie MIO-M1 verwendet. Beide Zelltypen wurden mit LPS stimuliert und nach Isolation und Anreicherung der Membranproteine wurden diese der massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Da die ERU neben ihrer tiermedizinischen Relevanz das einzige spontane Tiermodell für die humane autoimmune Uveitis darstellt (Deeg et al. 2001, Deeg et al. 2007c), die equine und die humane Retina jedoch anatomische Unterschiede aufweisen (Schnitzer 1988, Campbell et al. 2017), ist es von Nutzen, sowohl equine als auch humane Müllerzellen getrennt voneinander zu untersuchen. Im Gegensatz zur avaskulären Retina des Pferdes, bei der lediglich eine kleine Zone rund um den Austritt des N. opticus Blutgefäße aufweist (Schnitzer 1988, Ehrenhofer et al. 2002), ist die humane Netzhaut von mehreren Gefäßplexus durchzogen (Campbell et al. 2017). In vaskularisierten Netzhäuten tragen Müllerzellen mit ihren Zellfortsätzen zur inneren BRS bei (Tout et al. 1993), wohingegen es bei beim Pferd lediglich eine äußere BRS gibt, die aus den Endothelzellen der Kapillaren in der Choroidea, der Bruch'schen Membran und dem RPE besteht (Ehrenhofer et al. 2002, Fields et al. 2020). Ein

weiterer Unterschied zwischen equiner und humaner Retina besteht im Vorkommen und in der Lokalisation der Astrozyten, die bei Pferden lediglich in der Nervenfaserschicht der kleinen vaskularisierten Zone um den Discus nervi optici herum vorhanden sind (Schnitzer 1988, Ehrenhofer et al. 2002). Im Gegensatz dazu sind Astrozyten in vaskularisierten Netzhäuten in der gesamten Retina entlang der Kapillaren zu finden (Schnitzer 1988, Vecino et al. 2016). Daraus ergibt sich eine besondere Rolle für Müllerzellen in der equinen Retina, wo sie die einzigen Makrogliazellen darstellen (Schnitzer 1988). Diese Unterschiede machen die Notwendigkeit ersichtlich, sowohl equine als auch humane Müllerzellen zu untersuchen.

Zur Stimulation der Müllerzellen wurde das Endotoxin LPS verwendet, ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, der als klassisches Immunstimulans gilt (Beutler und Rietschel 2003). Durch die Bindung an seine Rezeptoren löst LPS eine starke Immunreaktion mit Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB sowie verschiedener Proteinkinasen mit darauffolgender Produktion pro-inflammatorischer Zytokine aus (Beutler und Rietschel 2003). Daher ist LPS als ein Modell zur Induktion einer Immunantwort etabliert und diente bereits in einer großen Anzahl an Studien der Untersuchung immunologischer Vorgänge (Arato et al. 2020, Feng et al. 2021, Gallorini et al. 2021). Zudem wird LPS zur Induktion der Endotoxin-induzierten Uveitis verwendet, einem Nagermodeill für die Uveitis des Menschen, das sich in vielen Studien bereits als nützlich erwiesen hat (Rosenbaum et al. 1980, Chu et al. 2016, Chen et al. 2021, Du et al. 2021). Auch bei Forschungsarbeiten zur Neuroinflammation in der Retina ist LPS als Immunstimulans etabliert (Allendorf et al. 2020a, Dando et al. 2021, Gao et al. 2021, Sun et al. 2021). Dennoch ist die ausschließliche Verwendung von LPS gewiss als eine Limitation dieser Arbeit zu betrachten und sollte in zukünftigen Studien durch den Gebrauch verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN-γ ergänzt werden.

Unser Ziel war es allerdings, zunächst einen Überblick über den pro-inflammatorischen Phänotyp der Müllerzellen zu schaffen. Unsere massenspektrometrische Analyse des Zellmembranproteoms ergab dabei eine deutliche Abweichung der Membranproteine nach Behandlung mit LPS, wobei die Proteine mit höherer Abundanz in den stimulierten Zellen vorwiegend mit immunologischen Stoffwechselwegen assoziiert waren (Fig. 2, Fig. 3, Publikation

II). Somit stellt diese Arbeit eine wertvolle Grundlage für weitere diesbezügliche Forschungen dar. Bei der vergleichenden Analyse konnten wir einen deutlichen Unterschied zwischen den eqMZ und den MIO-M1-Zellen feststellen. Den 507 identifizierten Membranproteinen der MIO-M1-Zellen standen 1.425 identifizierte Proteine der Zellmembran der eqMZ gegenüber (Suppl. Tab. 1, Suppl. Tab. 2, Publikation II). Die eqMZ wiesen zudem ein deutlich differenzierteres Reaktionsvermögen auf als die MIO-M1-Zellen. Während bei den eqMZ 79 Proteine mit signifikant höherer Abundanz (mind. 2-fach höher abundant und $p \leq 0,05$) nach Stimulation mit LPS identifiziert wurden, waren es in den Zellen der humanen Zelllinie 18 Proteine, die in diese Kategorie fielen (Tab. 1, Fig. 1, Publikation II). Die spontan immortalisierte humane Müllerzelllinie MIO-M1 wurde 2002 im Moorfields Institute of Ophthalmology etabliert und charakterisiert (Limb et al. 2002). Mikroskopische Untersuchungen sowie Western Blotting bestätigten die Expression bekannter Müllerzell-Marker und die Transmissionselektronenmikroskopie belegte eine den Ursprungszellen ähnliche Morphologie (Limb et al. 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zellen der etablierten Linie als Reaktion auf L-Glutamat ebenso depolarisierten, wie es für Müllerzellen beschrieben wurde (Limb et al. 2002). Da primäre humane Müllerzellen vor allem in großer Zahl schwer zu erhalten sind, stellen MIO-M1-Zellen ein wertvolles und häufig verwendetes Mittel zur Untersuchung humaner Müllerzellen dar (Guo et al. 2021, Rezzola et al. 2021). An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass die Verwendung von Zelllinien trotz ihres großen Nutzens kritisch zu betrachten ist, da genetische Veränderungen nach langer Kulturzeit zu einem veränderten Phänotyp führen können und zusammen mit Fehlidentifikationen und Kreuzkontaminationen eine häufige Quelle für fehlerhafte Ergebnisse sind (Schnichels et al. 2021). Die Zelllinie RGC-5 wurde beispielsweise in diversen Studien zu retinalen Ganglienzellen verwendet, bevor festgestellt wurde, dass diese Zellen nicht wie angegeben von Ganglienzellen von Ratten stammten, sondern dass es sich um murine Zellen mit Charakteristika einer Photorezeptor-Zelllinie handelte, die im Ursprungslabor vermutlich zur Kreuzkontamination geführt hatte (Krishnamoorthy et al. 2013). Um solchen Vorfällen vorzubeugen und genotypische Veränderungen aufzudecken, gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Authentifizierung der verwendeten Zelllinie wie die Bestimmung von short tandem repeats oder das next generation sequencing (Masters et al. 2001, Chen et al. 2020). Obwohl MIO-M1-Zellen als Müllerzelllinie gelten und als solche verwendet

werden, weisen sie bestimmte Charakteristika neuronaler Stammzellen auf und exprimieren sowohl Opsine als auch Proteine wie Peripherin und Recoverin, die als Marker postmitotischer neuronaler Zellen gelten (Lawrence et al. 2007, Hollborn et al. 2011). Daten, die auf Versuchen mit MIO-M1-Zellen basieren, sollten daher mit Bedacht interpretiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher zusätzlich zu den immortalisierten Zellen auch primäre Zellen untersucht, um einerseits einen Vergleich anstellen zu können und um andererseits Proteine zu identifizieren, die in beiden Zelltypen eine höhere Expression nach Stimulation mit LPS zeigen. Anhand unserer Analyse konnten wir sechs Proteine identifizieren, die nach der Stimulation in beiden Zelltypen signifikant und mindestens 2-fach höher abundant waren (Fig. 1, Publikation II), was auf eine besondere Relevanz dieser Proteine hinweist. Dass im Membranproteom der primären Zellen deutlich mehr Proteine identifiziert werden konnten als in den MIO-M1-Zellen, sowie die deutlich differenziertere Reaktion der primären Zellen auf den Stimulus belegt den Vorteil primärer Zellen. Viele Autoren geben den primären Zellen den Vorzug vor Zelllinien, da sie den Phänotyp der ursprünglichen Zellen eher abbilden (Pan et al. 2009, Schnichels et al. 2021). Dennoch ist bekannt, dass auch primäre Zellen *in vitro* vor allem durch fortwährende Passagen und lange Dauer in Kultur dedifferenzieren und einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp annehmen können (Hauck et al. 2003, Szober et al. 2012, Heslop et al. 2017). Um eine Dedifferenzierung der Zellen in Kultur vollkommen auszuschließen, müsste im Anschluss an die Isolation der Zellen aus der Retina die sofortige Messung der Zellen ohne zwischenzeitliche Kultur erfolgen, wie es in einer Studie zur proteomischen Charakterisierung muriner Müllerzellen etabliert wurde (Grosche et al. 2016). Das in dieser Studie entwickelte Protokoll zur Isolation von Müllerzellen basiert auf der Verwendung eines Antikörpers gegen Integrin $\beta 1$, eines Zelloberflächenmarkers von Müllerzellen, sowie auf magnetischer Zellseparation (Grosche et al. 2016). Die in der hier vorliegenden Arbeit erfolgte Stimulation der Müllerzellen mit LPS erforderte jedoch eine gewisse Verweildauer der Zellen in Kultur. Als Alternative zur Kultivierung einzelner isolierter Zellen könnten auch hier künftig retinale Explantate verwendet werden. Die Stimulation frisch aus der Retina isolierter Explantate mit LPS oder weiteren pro-inflammatorischen Stimulantien und die anschließende Isolation der Müllerzellen aus den Explantaten anhand des oben genannten Protokolls (Grosche et al. 2016) könnten eine Möglichkeit darstellen, die Dedifferenzierung der Zellen in Kultur zu umgehen.

Für die Charakterisierung der Müllerzellen wurde in dieser Studie bewusst die differenzielle Proteomanalyse als Hypothesen-generierender Ansatz gewählt. Mithilfe der quantitativ vergleichenden Massenspektrometrie war es uns möglich, unvoreingenommen, mit hoher Sensitivität und ohne den Gebrauch von Antikörpern eine Fülle an Daten zu generieren und somit maßgeblich zur Charakterisierung von Müllerzellen beizutragen. Aus der Arbeit mit equinem Probenmaterial ergibt sich häufig die Schwierigkeit, dass die Kreuzreaktivität der vorhandenen Antikörper mit equinem Material unbekannt ist bzw. dass schlicht keine geeigneten Antikörper für das zu untersuchende Protein zur Verfügung stehen, sodass in diesem Fall die Massenspektrometrie eine geeignete Alternative zu Antikörper-basierten Untersuchungen darstellt (Degroote et al. 2019, Tesena et al. 2021, Weigand et al. 2021). Zudem gewährt dieser Ansatz einen deutlich breiter gefächerten Einblick in die untersuchten Zellen als Antikörper-basierte Methoden wie ELISA, Immunzytologie oder Western Blotting. Anhand der gewonnenen Daten können dann Hypothesen generiert werden, wie im Fall von NEU1, das zunächst bei der massenspektrometrischen Untersuchung uveitischer Müllerzellen als höher abundant auffiel. Diese Entdeckung konnten wir immunhistologisch bestätigen, sodass wir auf der Grundlage der erhobenen Daten die Hypothese aufstellen konnten, dass damit eine Desialylierung des retinalen Gewebes einhergehen könnte.

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Zellen in der vorliegenden Arbeit legten wir den Fokus bewusst auf das Membranproteom, da Membranproteine maßgeblich die Immunantwort steuern (Chen und Flies 2013, Michael und Parsons 2020, Xia et al. 2021). Aufgrund ihrer hydrophoben Anteile sind sie jedoch nur schwer aus der Zellmembran zu extrahieren und daher in proteomischen Datensätzen häufig unterrepräsentiert (Grosche et al. 2016, Pauwels et al. 2021). Daher verwendeten wir ein Aminooxy-Biotinylierungs-Protokoll zur Isolation der Membranproteine. Dieser Ansatz zeigte bereits in mehreren Studien eine hohe Effizienz bei der Anreicherung von Membranproteinen verschiedener Zellen wie humaner T-Zellen oder mesenchymaler Stammzellen des menschlichen Knochenmarks (Zeng et al. 2009, Graessel et al. 2015, Matta et al. 2019). Auch für Müllerzellen wurde dieser Ansatz verwendet, um nach der Isolierung muriner Müllerzellen aus intakter Retina eine subzelluläre Auftrennung der Proteine zu erreichen (Grosche et al. 2016). Der hohe Anteil an Zellrezeptoren

sowie CD- und MHC-Molekülen, die wir identifizieren konnten, belegt die Effizienz und Nützlichkeit dieses Ansatzes. Um die hier gewonnenen Erkenntnisse zu erweitern, wäre es interessant, in einem nächsten Schritt ein vollständiges Zell-Lysat sowie das Sekretom von primären Müllerzellen und MIO-M1-Zellen nach Stimulation massenspektrometrisch zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit massenspektrometrisch generierten Datensätze wurden mithilfe zweier frei verfügbarer Online-Datenbanken sogenannten „pathway enrichment“-Analysen unterzogen. Dabei wird durch einen Abgleich der anhand der Massenspektrometrie identifizierten Proteine mit bestehenden Signalweg-Datenbanken analysiert, ob Proteine eines bestimmten Reaktionsweges oder einer bestimmten funktionellen Kategorie überrepräsentiert, also stärker vertreten sind als durch Zufall zu erwarten wäre (Ge et al. 2020, Jassal et al. 2020). Die massenspektrometrisch identifizierten Proteine werden also zum einen mit ihrer molekularen Funktion verknüpft, zum anderen werden funktionelle Zusammenhänge zwischen den Proteinen aufgezeigt (Ge et al. 2020, Jassal et al. 2020). Somit gewähren diese Analysen einen funktionellen Einblick in die massenspektrometrisch generierten Daten. In dieser Arbeit wurden zum einen die Datenbank ShinyGO (Version 0.61, <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>), zum anderen die Datenbank Reactome (Version 75, <https://reactome.org/>) verwendet und die erhaltenen Reaktionswege sowohl tabellarisch (Suppl. Tab. 3, Publikation II) als auch graphisch (Fig. 2, Fig. 3, Publikation II) dargestellt. Dabei wurden nur diejenigen Proteine mit den Datenbanken abgeglichen, die nach der Stimulation mit LPS signifikant ($p \leq 0,05$) und mindestens 2-fach höher abundant waren im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (Tab. 1, Publikation II). Die „pathway enrichment“-Analysen beider Datenbanken ergaben eine deutliche Überrepräsentation immunologischer Reaktionswege. Laut ShinyGO-Analyse stellte „Immune response“ den am deutlichsten überrepräsentierten Reaktionsweg in den eqMZ dar, dem 42 von den eingegebenen 79 Proteinen zugeordnet werden konnten (Suppl. Tab. 3, Publikation II). In den MIO-M1-Zellen konnten von den 18 untersuchten Proteinen 12 dem Reaktionsweg „Immune system process“ zugeordnet werden, der zusammen mit Zelladhäsionsprozessen an erster Stelle der überrepräsentierten Reaktionswege stand (Suppl. Tab. 3, Publikation II). Das aus der Reactome-Analyse resultierende Voronoi-Diagramm, in dem die Repräsentation der verschiedenen Stoffwechselwege farblich codiert dargestellt

wird, bestätigte diese Ergebnisse, da auch hier die übergeordnete Kategorie „Immune system“ in beiden Fällen am deutlichsten überrepräsentiert war (Suppl. Fig. 1, Suppl. Fig. 2, Publikation II). Dabei waren die untersuchten Proteine vor allem den Untergruppen „Adaptive Immune System“ und „Cytokine Signaling in Immune System“ zugeordnet (Fig. 3, Publikation II). Innerhalb des adaptiven Immunsystems waren die Reaktionswege „immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell“, „Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC“ und „MHC class II antigen presentation“ in beiden Zelltypen überrepräsentiert (Fig. 3, Publikation II). Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als Müllerzellen keine Zellen des Immunsystems darstellen, in der Literatur aber eine antigenpräsentierende Funktion diskutiert wird (Roberge et al. 1988, Mano et al. 1991, Heng et al. 2019). Roberge et al. stellten bereits 1988 fest, dass kultivierte Müllerzellen von Lewis-Ratten *in vitro* mit T-Zellen interagieren und dass diese Interaktion unterschiedliche Wirkungen haben kann (Roberge et al. 1988, Caspi und Roberge 1989). Neben der inhibitorischen Wirkung auf T-Zell-Linien *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Müllerzellen nach Inkubation mit Antigen und IFN γ -haltigem Splenozyten-Überstand und anschließender Behandlung mit Trypsin dazu in der Lage sind, S-Ag-spezifischen T-Zellen Antigen zu präsentieren (Roberge et al. 1988). In einer aktuelleren Studie an AIRE-Knockout Mäusen, einem Modell für autoimmune Uveoretinitis, wurde gezeigt, dass uveitische Müllerzellen MHC-Klasse-II-Moleküle hochregulieren und dass MHC-Klasse-II-positive Müllerzell-Fortsätze in direktem Kontakt mit CD4⁺ T-Zellen stehen (Heng et al. 2019). Während alle kernhaltigen Zellen des Körpers MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, anhand derer intrazelluläre Peptide CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden können, ist die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf APZ beschränkt, die durch die Präsentation extrazellulärer Antigene CD4⁺ T-Zellen aktivieren (Neefjes et al. 2011). Heng et al. folgerten daher, dass Müllerzellen in den Netzhäuten von AIRE-Knockout-Mäusen möglicherweise als APZ fungieren (Heng et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit konnte bereits in unstimulierten eqMZ die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen gezeigt werden, wobei diese Proteine nach Stimulation mit LPS deutlich höher abundant waren (Tab. 1, Publikation II; die MHC-Klasse-II-Moleküle wurden nach den humanen Orthologen HLA-DRA und HLA-DRB1 benannt, um die equinen und humanen Zellen anhand der oben genannten Datenbanken vergleichen zu können). Dies bestätigt die Hypothese, dass Müllerzellen eine

Funktion als APZ innehaben könnten. In einer immunhistologischen Studie an Augen gesunder und an ERU erkrankter Pferde war die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in der Retina im physiologischen Zustand auf die Endothelzellen der Gefäße rund um den Austritt des N. opticus beschränkt (Romeike et al. 1998). In zwei uveitischen Augen konnte hingegen eine MHC-Klasse-II-Expression in GFAP-positiven Zellen innerhalb einer retinalen Glia-Narbe festgestellt werden (Romeike et al. 1998). Zudem wurde in der Netzhaut eines Patienten mit subretinaler Fibrose die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in Müllerzellen gezeigt (Kim et al. 1987). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie an Ratten nach experimenteller Induktion von Uveitis die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen lediglich in Mikroglia, nicht aber in Müllerzellen nachgewiesen (Zhang et al. 1997). Es ist allerdings bekannt, dass das Ratten-Modell in manchen Aspekten der humanen Uveitis weniger ähnlich ist als das Mäuse-Modell (Caspi et al. 1988). Anhand des hochauflösenden Ansatzes, der in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde, konnten wir die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in unstimulierten sowie stimulierten equinen Müllerzellen zeigen. Im Gegensatz dazu war in den MIO-M1-Zellen keine Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen festzustellen, weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand (Suppl. Tab. 1, Publikation II). Eine mögliche Ursache für die fehlende Induzierbarkeit von MHC-Klasse-II-Molekülen in MIO-M1-Zellen in unserer Studie könnte die Dedifferenzierung der Zelllinie darstellen, da viele Zelllinien stark von der Physiologie der originalen Zellen abweichen (Pan et al. 2009). In einer Studie an primären humanen Müllerzellen konnte nach Stimulation mit IFN- γ eine Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen gezeigt werden (Mano et al. 1991). Daher sollte in weiteren Studien die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in MIO-M1-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ getestet und ein Vergleich zwischen primären humanen Müllerzellen und der MIO-M1-Zelllinie angestellt werden. Zudem sollten in einem nächsten Schritt auch equine Müllerzellen mit IFN- γ stimuliert und anschließend auf Expression von MHC-Klasse-II untersucht werden, da uveitogene T-Zellen IFN- γ sezernieren (Xu et al. 1997, Saldinger et al. 2020), sodass IFN- γ auch *in vivo* zur Induktion der MHC-II-Expression in residenten Zellen der Retina führen könnte (Caspi 2006).

Neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex der APZ ist für die Aktivierung naiver T-Zellen die Bindung an kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 notwendig, die von APZ auf ihrer

Zelloberfläche exprimiert werden (Van Gool et al. 1996). Zu den professionellen APZ, die alle Voraussetzungen erfüllen, um naive T-Zellen aktivieren zu können, gehören neben den DZ auch Monozyten und Makrophagen (Kambayashi und Laufer 2014). DZ verfügen über Rezeptoren, mit denen sie Pathogene erkennen und aufnehmen können, sie weisen auch im ruhenden Zustand eine hohe Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf, sie exprimieren nach Aktivierung kostimulatorische Moleküle und sie sind in der Lage, Zytokine zu sezernieren (den Haan et al. 2014). Damit sind sie optimal geeignet, naiven T-Zellen ihr Antigen zu präsentieren und sie so zu aktivieren (den Haan et al. 2014). Neben diesen professionellen APZ ist zudem eine Reihe an sogenannten unprofessionellen APZ bekannt, in denen durch verschiedene Stimuli die Expression von MHC-Klasse-II- und zum Teil auch von kostimulatorischen Molekülen induziert werden kann, für die aber nur in bestimmten Kontexten eine antigenpräsentierende Funktion nachgewiesen werden konnte und die meist nicht alle Kriterien für professionelle Antigenpräsentation erfüllen (Kambayashi und Laufer 2014). Dazu gehören hämatopoetische Zellen wie Mastzellen, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten aber auch Endothelzellen, synoviale Fibroblasten, Hepatozyten, Sertoli-Zellen und intestinale Epithelzellen (Boots et al. 1994, Kambayashi und Laufer 2014, Lin und Loré 2017, Mehrfeld et al. 2018, Arato et al. 2020, Heuberger et al. 2021, Valenzuela 2021). Unsere Ergebnisse zeigen, dass eqMZ nach Stimulation mit LPS neben MHC-Klasse-II-Molekülen auch vermehrt kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 exprimieren (Tab. 1, Publikation II), was einen deutlichen Hinweis auf eine mögliche antigenpräsentierende Funktion der Müllerzellen innerhalb der Retina darstellt. Die Expression von CD40 in murinen Müllerzellen wurde im Zusammenhang mit retinaler Inflammation im Rahmen von Diabetes gezeigt (Portillo et al. 2017, Dierschke et al. 2020), wohingegen die Expression von CD80 und CD86 im Auge bis dato eher mit Mikrogliazellen in Verbindung gebracht wurde (Dando et al. 2021). In einer Studie an frisch isolierten humanen neutrophilen Granulozyten, die wie oben angeführt als unprofessionelle APZ diskutiert werden, konnte ohne Stimulation keine Expression von MHC-Klasse-II- oder kostimulatorischen Molekülen nachgewiesen werden (Vono et al. 2017). Die Koinkubation der Zellen mit Antigen und antigenspezifischen CD4⁺ T-Gedächtniszellen oder mit dem Überstand aktivierter T-Zellen bewirkte jedoch die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen

sowie den kostimulatorischen Molekülen CD40 und CD80 auf der Zelloberfläche (Vono et al. 2017). In diesem Fall waren die neutrophilen Granulozyten auch in der Lage, antigenspezifischen CD4⁺ T-Gedächtniszellen Antigene zu präsentieren (Vono et al. 2017). Die Stimulation mit LPS führte dabei lediglich zur Expression kostimulatorischer Moleküle, nicht aber zur MHC-Klasse-II-Expression (Vono et al. 2017). Die Autoren schlussfolgerten, dass neutrophile Zellen nicht in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren, sondern auf bereits aktivierte T-Zellen angewiesen sind, um einen antigenpräsentierenden Phänotyp anzunehmen (Vono et al. 2017). Auf diese Weise stimuliert, können sie dann aber als APZ für T-Gedächtniszellen fungieren (Vono et al. 2017). Im Gegensatz dazu war in unserer Studie an Müllerzellen die Stimulation mit LPS ausreichend, um eine vermehrte Expression von sowohl MHC-Klasse-II-Molekülen, als auch kostimulatorischen Molekülen hervorzurufen. Basierend auf diesen Ergebnissen stellen wir die Hypothese auf, dass ein inflammatorisches Milieu zur Aktivierung der Müllerzellen und der Transformation in einen antigenpräsentierenden Phänotyp führt. Die Folgen dieses phänotypischen Wandels müssen in zukünftigen Studien geklärt werden. Zudem wäre es von großem Interesse, zu testen, ob die in dieser Arbeit *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf die Entzündung des Auges *in vivo* übertragbar sind. Dazu könnte zunächst die immunhistologische Untersuchung der in dieser Studie höher abundanten Proteine in Netzhaut-Schnitten gesunder und an ERU erkrankter Pferde erfolgen. Sollte die Expression der hier gezeigten kostimulatorischen Moleküle auch in uveitischer Retina zu beobachten sein, wäre dies eine wertvolle Erkenntnis hinsichtlich der Pathogenese der ERU und der Beteiligung der Müllerzellen im uveitischen Krankheitsgeschehen. Da die Retina ein immunprivilegiertes Organ darstellt und naive T-Zellen die BRS nicht überqueren können, kommen Müllerzellen vorwiegend mit bereits aktivierten T-Zellen in Kontakt (Caspi 2006, Kleinwort et al. 2016). Im Falle eines Uveitis-Schubs kommt es durch die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie und den Zusammenbruch der BRS zu einer Migration aktivierter CD4⁺T-Zellen in die Retina und in der Folge zur Entzündung und Zerstörung des retinalen Gewebes (Deeg et al. 2002b, Kleinwort et al. 2016). Im Ratten-Modell für EAU konnte gezeigt werden, dass sowohl antigenspezifische uveitogene T-Zellen als auch unspezifisch aktivierte, aber nicht autoreaktive T-Zellen in das Auge gelangen, wobei jedoch nur die uveitogenen T-Zellen nach einigen Tagen einen Uveitis-Schub auslösen

(Prendergast et al. 1998, Thureau et al. 2004). Daraus wurde gefolgert, dass sich ein Uveitis-Schub erst dadurch entwickelt, dass den in das Auge eingedrungenen T-Zellen das Autoantigen präsentiert wird (Prendergast et al. 1998, Thureau et al. 2004). Weder im Fall der ERU, noch bei der EAU ist abschließend geklärt, durch welche Zellen die retinalen Autoantigene im Auge den T-Zellen präsentiert werden (Degroote und Deeg 2020), da in der Retina im physiologischen Zustand nur wenige MHC-Klasse-II⁺ Zellen lokalisiert sind (Romeike et al. 1998, Lipski et al. 2017). In der Netzhaut von C57BL/6-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die wenigen Zellen, die im physiologischen Zustand MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, nicht hämatopoetischen Ursprungs (CD45⁻ CD11b⁻), also weder Makrophagen noch Mikroglia waren und dass nach Induktion von EAU durch adoptiven Transfer die Zahl der MHC-Klasse-II⁺ Zellen massiv anstieg (Lipski et al. 2017). Neben den CD45⁻ CD11b⁻ Zellen, die den größten Anteil der MHC-Klasse-II-Moleküle exprimierenden Zellen ausmachten, exprimierten auch CD45⁺ CD11b⁺ Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle, und zwar mit deutlich höherer Intensität als die nicht-hämatopoetischen Zellen (Lipski et al. 2017). Zudem exprimierten die MHC-Klasse-II⁺ Zellen die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 (Lipski et al. 2017). Die CD45⁺ CD11b⁺ Zellen wurden weiterhin unterteilt in infiltrierende Makrophagen (Ly6C⁺) und residente Mikroglia (Ly6C⁻), wobei funktionelle Annotations-Analysen keine größeren Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen aufzeigten (Lipski et al. 2017). Diese Analysen ergaben jedoch eine wichtigere Rolle der hämatopoetischen Zellen im Vergleich zu den nicht-hämatopoetischen Zellen bei der Präsentation von Antigenen (Lipski et al. 2017). Weder in Endothelzellen noch in Müllerzellen konnte in dieser Studie eine deutliche MHC-Klasse-II-Expression gezeigt werden (Lipski et al. 2017). Jedoch zeigte eine Studie an einem mit LPS-induzierten Uveitis-Modell in Mäusen, dass die Dichte an Mikroglia in der Retina zwar im uveitischen Zustand zunahm, die retinalen Mikroglia im Gegensatz zu den Mikroglia des Uveal-Trakts jedoch nicht in der Lage waren, die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 hochzuregulieren und die Proliferation naiver CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren (Dando et al. 2021). Auf der Grundlage der bereits gezeigten MHC-Klasse-II-Expression in uveitischen Müllerzellen (Romeike et al. 1998) sowie basierend auf unseren Ergebnissen, die zeigen, dass eqMZ nach der Stimulation mit einem pro-inflammatorischen Agens sowohl MHC-Klasse-II- als auch die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und

CD86 exprimieren, kann angenommen werden, dass Müllerzellen bei der Uveitis des Pferdes an der Präsentation von Autoantigenen beteiligt sein könnten. Dabei ist zu bedenken, dass die Reaktivierung der autoreaktiven T-Zellen, die in der Peripherie bereits aktiviert wurden, weniger anspruchsvoll ist als die Aktivierung naiver T-Zellen und somit möglicherweise auch durch unprofessionelle APZ bewerkstelligt werden könnte (Croft et al. 1994). Die eingedrungenen T-Zellen sezernieren unter anderem IFN- γ (Saldinger et al. 2020), was zur Aktivierung der Müllerzellen und zu einem Wandel ihres Phänotyps sowie der Präsentation von Autoantigenen führen könnte (Caspi 2006). Dass Müllerzellen im Rahmen von ERU aktiviert werden und IFN- γ exprimieren, wurde bereits gezeigt (Hauck et al. 2007). Somit ist denkbar, dass Müllerzellen an der Reaktivierung uveitogener T-Zellen beteiligt sein könnten. Zudem werden im Laufe eines Uveitis-Schubs weitere Entzündungszellen rekrutiert (Kleinwort et al. 2016). Dieses inflammatorische Milieu könnte dazu führen, dass auch naive T-Zellen die zerstörte BRS überwinden und in der Retina durch Präsentation ihres Autoantigens auf APZ aktiviert werden könnten (Caspi 2006), was wiederum eine Ursache für das bei der ERU bereits gezeigte Epitop Spreading darstellen könnte (Deeg et al. 2006a). Schlussendlich wird zur Bestätigung dieser Überlegung zunächst geklärt werden müssen, ob der in dieser Arbeit gezeigte antigenpräsentierende Phänotyp der Müllerzellen auch im Rahmen der ERU nachgewiesen werden kann, da die alleinige Stimulation der isolierten Zellen mit LPS lediglich einen aktivierten Phänotyp der Müllerzellen, nicht aber das uveitische Milieu der Retina vollumfänglich repräsentieren kann. Eine Koinkubation aktivierter uveitogener T-Zellen mit Müllerzellen könnte möglicherweise neue Erkenntnisse bezüglich der Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Zellen im uveitischen Geschehen liefern. Dabei sollte beispielsweise untersucht werden, ob Müllerzellen nach dieser Koinkubation vermehrt MHC-Klasse-II- und kostimulatorische Moleküle exprimieren oder Zytokine sezernieren. Zudem könnte, im Anschluss an diese Kokultur, die Proliferation der T-Zellen gemessen und ihr Zytokin-Profil bestimmt werden. Auf diese Weise wäre es möglich, sowohl über die Aktivierung von Müllerzellen durch uveitogene T-Zellen, als auch über die antigenpräsentierende Funktion der Müllerzellen Rückschlüsse zu ziehen. Als weiterer Schritt könnte die Blockierung einzelner kostimulatorischer oder inhibitorischer Moleküle während der oben genannten Koinkubation Aufschluss geben über pathogenetisch relevante Mechanismen.

Um Autoantigene präsentieren zu können, müssten Müllerzellen zunächst in der Lage sein, diese Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Professionelle APZ verfügen dafür über Mustererkennungsrezeptoren wie beispielsweise TLRs, mit denen sie Pathogene erkennen und aufnehmen können (Kambayashi und Laufer 2014). Murine Müllerzellen sowie MIO-M1-Zellen exprimieren verschiedene TLRs und können diese Expression nach der Stimulation mit dem jeweiligen Agonisten verstärken (Kumar und Shamsuddin 2012). MIO-M1-Zellen sind zudem in der Lage, Bakterien zu phagozytieren (Singh et al. 2014) und in einem Mäuse-Modell für Retinitis pigmentosa wurde gezeigt, dass Müllerzellen absterbende und tote Photorezeptoren phagozytieren und sie anschließend in Phagolysosomen abbauen (Sakami et al. 2019). Es ist daher durchaus denkbar, dass Müllerzellen tatsächlich in der Lage sind, Autoantigene aufzunehmen und sie aktivierten T-Zellen zu präsentieren.

Während die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 ausschließlich in den eqMZ identifiziert wurden, konnte CD82 in beiden Zelltypen mit höherer Abundanz nach Stimulation nachgewiesen werden (Fig. 1, Tab. 1, Publikation II). In MIO-M1-Zellen konnte die Expression von CD82 bereits bestätigt werden (Lee et al. 2021), hingegen liegen unserer Recherche zufolge keine Daten zu CD82 in equinen Müllerzellen vor (Pubmed-Recherche Stand August 2021). Da CD82 *in vitro* vor allem während der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung die Bindung zwischen ICAM-1 (*engl.* intercellular adhesion molecule 1) auf APZ und LFA-1 (*engl.* Lymphocyte Function-Associated Antigen 1) auf T-Zellen verstärkt (Shibagaki et al. 1999), bestätigt die Expression von CD82 in mit LPS stimulierten Müllerzellen die Hypothese, dass in der entzündeten Retina eine Interaktion zwischen T-Zellen und Müllerzellen stattfinden könnte. Diese Überlegung deckt sich mit dem starken Anstieg der Expression von ICOSLG (*engl.* inducible T-cell costimulator ligand), der sowohl in den MIO-M1-Zellen als auch in den eqMZ durch die Stimulation mit LPS ausgelöst wurde (Fig. 1, Tab. 1, Publikation II). Laut dem humanen Proteinatlas wird ICOSLG auf mRNA-Ebene in Müllerzellen exprimiert (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000160223-ICOSLG/celltype/eye>), in der Literatur wurde die Expression von ICOSLG auf Protein-Ebene jedoch unseres Wissens nach in Müllerzellen noch nicht beschrieben (PubMed-Recherche Stand August 2021). ICOSLG wird zum einen von APZ (Yoshinaga et al. 1999), aber im Rahmen von Entzündungsreaktionen auch von nicht-hämatopoetischen Zellen

exprimiert (Qian et al. 2006, Koh et al. 2019, Valenzuela 2021) und dient als Ligand für ICOS (*engl.* inducible T-cell costimulator), das auf aktivierten T-Zellen und T-Gedächtniszellen exprimiert wird (Yoshinaga et al. 1999). Die Bindung von ICOS an seinen Liganden wirkt als kostimulatorisches Signal und hat kontextabhängig unterschiedliche Wirkungen auf die Differenzierung und Effektorfunktion der aktivierten T-Zellen (Wikenheiser und Stumhofer 2016). In der Retina von Mäusen mit EAU konnte ICOS auf den meisten infiltrierenden T-Zellen identifiziert werden (Usui et al. 2006). Während im physiologischen Zustand anhand von RT-PCR kaum Expression von ICOSLG mRNA im okulären Gewebe gefunden wurde, war 21 Tage nach der Induktion von EAU eine deutliche mRNA-Expression zu sehen (Usui et al. 2006). Allerdings wurde in dieser Studie nicht spezifiziert, welche retinalen Zellen ICOSLG exprimieren. Es wurde aber gezeigt, dass ein Antikörper gegen ICOSLG *in vivo* das Krankheitsgeschehen deutlich mildern konnte (Usui et al. 2006). Dieser Effekt trat allerdings nur ein, wenn der Antikörper in der Effektorphase verabreicht wurde, nicht jedoch in der Phase der Induktion. *In vitro* inhibierte der Antikörper zudem die Proliferation CD4⁺ T-Zellen und die Produktion von IFN- γ (Usui et al. 2006). Dies wurde in einer aktuelleren Studie bestätigt, in der neuartige VNARs (*engl.* variable domain of the Novel Antigen Receptor) gegen ICOSLG sowohl die klinischen als auch die histologischen Befunde der IRBP-induzierten Uveitis in Mäusen deutlich milderten (Kovaleva et al. 2017). Laut unserem Kenntnisstand ist die Funktion von ICOS-ICOSLG in ERU zum aktuellen Zeitpunkt unbekannt (PubMed-Recherche Stand August 2021). Daher sollte in weiteren Studien geklärt werden, ob uveitische Müllerzellen ICOSLG exprimieren und durch die Bindung zwischen ICOS auf den aktivierten eindringenden T-Zellen und ICOSLG auf Müllerzellen eine Kostimulation der T-Zellen stattfindet. Interessant ist, dass in der Studie von Usui et al. die Milderung der Symptome durch die Hemmung von ICOSLG nur dann eintrat, wenn die Krankheit bereits von der Induktions- in die Effektorphase übergegangen war (Usui et al. 2006). Dies deckt sich mit der Tatsache, dass lediglich aktivierte T-Zellen ICOS exprimieren (Yoshinaga et al. 1999) und steht im Einklang mit der Überlegung, dass die Interaktion zwischen ICOS auf autoreaktiven T-Zellen und ICOSLG auf retinalen Zellen zur Reaktivierung und Proliferation von in der Peripherie aktivierten T-Zellen sowie T-Gedächtniszellen führen könnte (Usui et al. 2006). Im Gesamten betrachtet wäre es also denkbar, dass Müllerzellen, die im Rahmen des Entzündungsgeschehens bei

einem uveitischen Schub aktiviert werden, als unprofessionelle APZ kostimulatorische Moleküle exprimieren und somit dazu fähig sind, die in die Retina einwandernden uveitogenen T-Zellen zu reaktivieren.

Nun muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Stimulation der Müllerzellen durch LPS nicht nur zur Expression von kostimulatorischen Molekülen führte, sondern dass auch inhibitorische Moleküle vermehrt exprimiert wurden. Dazu gehören PD-L1 (CD274) in den eqMZ und PD-L2 in den MIO-M1-Zellen (Tab. 1, Publikation II). In verschiedenen humanen okulären Zelllinien konnte die Expression von PD-L1 und PD-L2 auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden, allerdings wurden in dieser Studie keine Müllerzellen bzw. MIO-M1-Zellen untersucht (Yang et al. 2009). Die immunhistologische Untersuchung humaner Retina ergab keine Expression von PD-L1 und PD-L2 (Yang et al. 2009). In muriner Retina wurde jedoch festgestellt, dass Müllerzellen PD-L1 exprimieren (Sham et al. 2012). Während für humane corneale Endothel- und Epithelzellen sowie für murine und humane RPE-Zellen *in vitro* ein hemmender Effekt von PD-L1 auf T-Zellen gezeigt wurde (Sugita et al. 2009b, Yang et al. 2009, Sugita et al. 2013), ist dieses Phänomen unseres Wissens in Müllerzellen nicht bekannt (PubMed-Recherche Stand August 2021). In EAU-Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass der PD-1/PD-L1-Signalweg bei der Unterdrückung der T-Effektorzellen durch regulatorische T-Zellen eine maßgebliche Rolle spielt (Lee und Taylor 2015). Inwiefern PD-L1 in equinen Müllerzellen an der Auflösung retinaler Entzündungsreaktionen beteiligt ist, sollte daher in weiteren Studien untersucht werden.

Neben einem Anstieg der Expression kostimulatorischer aber auch inhibitorischer Moleküle konnten wir feststellen, dass LPS in Müllerzellen auch eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 (*engl.* vascular cell adhesion molecule 1) und JAM2 (*engl.* junctional adhesion molecule 2) bewirkte (Fig. 1, Tab. 1, Publikation II). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der durch LPS induzierbaren Expression von ICAM-1 in Müllerzellen von Ratten und Mäusen (Drescher und Whittum-Hudson 1996, Gu et al. 2018). Vor allem in den MIO-M1-Zellen stand ein maßgeblicher Teil der überrepräsentierten Reaktionswege im Zusammenhang mit Zelladhäsionsprozessen (Fig. 2A, Publikation II). Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da die Adhäsion und Migration von Entzündungszellen durch die BRS in die Retina einen pathogenetischen

Schlüsselmechanismus bei der autoimmunen Uveitis darstellt (Wiedemann et al. 2020). In EAU-Modellen konnte dabei bereits gezeigt werden, dass der Anstieg der ICAM-1-Expression in retinalen Blutgefäßen sowohl zeitlich als auch örtlich mit der Adhäsion und Extravasation der Entzündungszellen durch die nicht mehr intakte BRS assoziiert war (Xu et al. 2003). Die vermehrte Expression von ICAM-1 in Mäusen mit LPS-induzierter Uveitis konnte durch die lokale Applikation eines Antagonisten gegen LFA-1 (den Bindungspartner von ICAM-1) *in vivo* blockiert werden, was eine starke Milderung der Entzündungsreaktion bewirkte (Qiu et al. 2021). Während die Expression von ICAM-1 bereits in gesunden Augen von Mäusen detektierbar ist, wird die Expression von VCAM-1 erst durch die Induktion von Uveitis durch adoptiven Transfer uveitogener T-Zellen hervorgerufen (Dewispelaere et al. 2015). In uveitischer muriner Retina wiesen vor allem RPE-Zellen und Endothelzellen eine vermehrte ICAM-1-Expression auf (Dewispelaere et al. 2015). Im Gegensatz dazu wurde VCAM-1 vorwiegend in Zellen der inneren BRS exprimiert, unter anderem auch in den Müllerzell-Fortsätzen rund um die retinalen Gefäße (Dewispelaere et al. 2015). Die unterschiedliche Expression der beiden Moleküle könnten auf verschiedene Eintrittspforten für T-Zellen in die Retina hindeuten (Dewispelaere et al. 2015). Hier sei noch einmal auf den anatomischen Unterschied zwischen humaner und equiner Retina verwiesen. Wie Menschen verfügen Mäuse und Ratten, die als Versuchstiere für die EAU verwendet werden, über eine vaskularisierte Retina (Schnitzer 1988). In diesem Modell für die humane Uveitis können Entzündungszellen daher sowohl durch die äußere als auch die innere BRS in die Retina einwandern (Dewispelaere et al. 2015). Im Gegensatz dazu findet die Migration der aktivierten Zellen in die avaskuläre Retina des Pferdes nur in der kleinen vaskularisierten Zone rund um den Austritt des N. opticus und ansonsten über die äußere BRS statt (Deeg et al. 2002a). Da Müllerzellen nicht in direktem Kontakt zur äußeren BRS stehen, ist bei der ERU eine Beteiligung von ICAM-1 in Müllerzellen an der Migration von Entzündungszellen in die Retina lediglich in der kleinen vaskularisierten Zone denkbar. Die Zelladhäsion wurde zudem in einen interessanten Zusammenhang mit der Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Zellen gestellt: Sowohl *in vivo* im Mäusemodell als auch *in vitro* mit humanen neutrophilen Granulozyten konnte gezeigt werden, dass aktivierte Neutrophile Sialidase-Aktivität aufweisen und dass diese beteiligt ist an der Adhäsion und Migration der Zellen durch das Endothel (Cross et al. 2003, Sakarya

et al. 2004). Dies könnte dadurch zustande kommen, dass sowohl ICAM-1 in Endothelzellen als auch sein Ligand LFA-1 auf den neutrophilen Granulozyten (CD11 α /CD18) über α 2,6- verknüpfte terminale Sialinsäurereste verfügen, die die Bindung zwischen den beiden Bindungspartnern hindern können (Feng et al. 2011). Durch die Expression von NEU1 auf ihrer Zelloberfläche sind aktivierte humane Neutrophile einer Studie zufolge in der Lage, diese terminalen Sialinsäuren abzuspalten (Feng et al. 2011). Die Autoren der Studie schlussfolgerten, dass die endogene Sialidase-Aktivität von aktivierten Neutrophilen durch die Abspaltung der Sialinsäuren sowohl von LFA-1 als auch von ICAM-1 zur besseren Bindung zwischen diesen beiden Molekülen und somit zwischen dem Endothel und den neutrophilen Granulozyten führt und dadurch zur Adhäsion und Migration der Neutrophilen durch das Endothel beiträgt (Feng et al. 2011). Da wir zum einen eine NEU1-Expression in uveitischen Müllerzellen, zum anderen eine ICAM-1-Expression in LPS-stimulierten eqMZ zeigen konnten, sollte der Zusammenhang zwischen Desialylierung und Zelladhäsion auch im Pferdmodell weiter untersucht werden. Somit wäre es zunächst interessant, die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in uveitischen Netzhäuten von Pferden genauer zu untersuchen. Im Membranproteom von Retina-Lysaten wurde die vermehrte Expression von ICAM-1 im uveitischen Zustand bereits nachgewiesen, wobei jedoch nicht spezifiziert wurde, welche Zellen in diesem Fall ICAM-1 exprimierten (Hauck et al. 2010). Neben der Funktion als Adhäsionsmolekül für Entzündungszellen ist bekannt, dass ICAM-1 auf APZ durch die Bindung an LFA-1 auf T-Zellen an der Bildung der immunologischen Synapse und der Aktivierung naiver T-Zellen beteiligt ist (Dustin und Springer 1989, Van Seventer et al. 1990, Grakoui et al. 1999). Somit ist es durchaus plausibel, anzunehmen, dass die Bindung zwischen LFA-1 auf aktivierten T-Zellen und ICAM-1 in uveitischen Müllerzellen zur Interaktion zwischen den eindringenden und den residenten Zellen und somit zur Reaktivierung und Proliferation der autoreaktiven T-Zellen im Rahmen der ERU beiträgt. Weitere Studien mit autoreaktiven T-Zellen und uveitischen Müllerzellen sind zukünftig notwendig, um diese Zusammenhänge weiter zu beleuchten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Müllerzellen stellen in der avaskulären Retina des Pferdes die einzigen Makrogliazellen dar und tragen maßgeblich zur Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase bei. Pathologische Veränderungen der Retina führen zur Gliose der Müllerzellen, einem zellulären Versuch, das retinale Gewebe wiederherzustellen und weiteren Schaden zu vermindern, der allerdings häufig mit einem Funktionsverlust einhergeht. Neben der Unterstützung und dem Schutz der Photorezeptoren gibt es Hinweise darauf, dass Müllerzellen immunologische Funktionen ausüben können. Auch im Verlauf der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) wurden gliotische Veränderungen sowie ein pro-inflammatorischer Phänotyp der Müllerzellen beschrieben. Die ERU ist eine autoimmun bedingte, chronisch rezidivierende intraokuläre Entzündung, die häufig zur Erblindung der erkrankten Pferde führt. Ätiologie und Pathogenese der ERU sind bis heute nicht abschließend geklärt. Zudem ist kaum bekannt, inwiefern Müllerzellen an der Immunantwort der Retina beteiligt sind und welche pathogenetische Rolle sie bei der ERU spielen. Ziel dieser Studie war es daher, die Reaktion von Müllerzellen auf ein inflammatorisches Milieu näher zu charakterisieren und somit einen Einblick in ihre Beteiligung an der retinalen Inflammation und an der Pathogenese der ERU zu erhalten. Dazu wurden zwei verschiedene Modelle herangezogen. Die immunhistologische Untersuchung von Netzhäuten gesunder und an ERU erkrankter Pferde ergab eine vermehrte Expression der Neuraminidase NEU1 in uveitischen Müllerzellen. Da Neuraminidasen terminale Sialinsäuren von den darunterliegenden Glykoproteinen abspalten, wurde anhand der sialinsäurespezifischen Lektine MAL, MAH und SNA der Sialylierungszustand der retinalen Zellen untersucht. Dabei konnte eine signifikante Verringerung der terminalen Sialinsäuren in den Netzhäuten von an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen werden. Eine vermehrte Expression von NEU1 und die damit einhergehende Abspaltung terminaler Sialinsäuren wurde in verschiedenen Modellen mit einer Verstärkung der Entzündungsreaktion in Zusammenhang gebracht. Daher ist es denkbar, dass Müllerzellen durch die vermehrte Expression von NEU1 die im Rahmen der ERU ablaufenden Entzündungsvorgänge in der Retina verstärken. Neben der immunhistologischen Untersuchung wurde in dieser Arbeit eine differenzielle Proteomanalyse primärer equiner Müllerzellen (eqMZ) sowie immortalisierter humaner Müllerzellen (MIO-M1-

Zellen) nach *in-vitro*-Stimulation mit LPS durchgeführt. Da Proteine der Zellmembran in der Immunologie von besonderem Interesse, jedoch aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in massenspektrometrischen Datensätzen häufig unterrepräsentiert sind, wurde in dieser Arbeit ein Protokoll zur Anreicherung der Zellmembranproteine gewählt. Labelfreie LC-MS/MS-Analyse der Zellmembranproteine ergab insgesamt 507 Proteine in MIO-M1-Zellen, von denen 18 nach der Stimulation mit LPS signifikant höher abundant waren, während das Zellmembranproteom der eqMZ 1425 Proteine umfasste, mit 79 höher abundanten Proteinen nach LPS-Stimulation. Die Untersuchung des Datensatzes auf überrepräsentierte Stoffwechselwege ergab neben Zytokin-Signalwegen und Zelladhäsionsprozessen auch MHC-Klasse-I- sowie MHC-Klasse-II-medierte Antigenpräsentation. Übereinstimmend damit exprimierten eqMZ sowohl MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Moleküle als auch die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86. Weiterhin wurden sechs Proteine identifiziert, die sowohl in den eqMZ als auch in den MIO-M1-Zellen als Reaktion auf LPS vermehrt exprimiert wurden, und die mit Zelladhäsion sowie mit der Interaktion zwischen T-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen in Zusammenhang stehen. Dazu gehörten die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, JAM2, eine schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls sowie die kostimulatorischen Moleküle CD82 und ICOSLG. Die in dieser Arbeit erfolgte hochauflösende proteomische Charakterisierung aktivierter Müllerzellen deutet somit auf eine antigenpräsentierende Funktion von Müllerzellen hin und bildet eine Grundlage für weitere Forschungen zur Beteiligung von Müllerzellen an der retinalen Immunantwort, unter anderem im Rahmen der ERU. Künftige Studien sollten die hier geschilderten Ergebnisse und Zusammenhänge anhand von organotypischen Netzhautkulturen sowie durch die Koinkubation von Müllerzellen mit uveitogenen T-Zellen weiter untersuchen.

7 SUMMARY

In the avascular retina of the horse, Müller cells constitute the only macroglial cells and as such, they play a profound role in the maintenance of retinal homeostasis. Pathological changes in the retina lead to Müller cell gliosis, a cellular attempt to restore retinal tissue and reduce further damage. However, this is often associated with a loss of function. In addition to supporting and protecting photoreceptors, there is evidence that Müller cells are able to exert immunological functions. Gliosis and a pro-inflammatory phenotype of Müller cells have also been described in the course of equine recurrent uveitis (ERU), an autoimmune-mediated, chronically recurring intraocular inflammation eventually leading to blindness in affected horses. To date, the etiology and pathogenesis of ERU have not yet been fully elucidated. In addition, little is known about the extent to which Müller cells are involved in the immune response of the retina and about their pathogenetic role in ERU. Therefore, the aim of this study was to characterize the reaction of Müller cells to an inflammatory environment in more detail and thus to gain insight into their involvement in retinal inflammation and in the pathogenesis of ERU. To this end, two different models were used. Immunohistological examination of the retina of healthy horses and horses suffering from ERU revealed an increased expression of NEU1 in uveitic Müller cells. Since neuraminidases remove terminal sialic acids from underlying glycoproteins, the sialylation status of retinal cells was investigated using the sialic acid-specific lectins MAL, MAH and SNA. Thereby, a significant reduction of terminal sialic acids could be demonstrated in retinas of horses suffering from ERU. Increased expression of NEU1 and concomitant cleavage of terminal sialic acids was associated with an enhanced inflammatory reaction in various models. It is therefore conceivable that increased expression of NEU1 in Müller cells amplifies the inflammatory processes taking place in the retina in the course of ERU. In addition to the immunohistological examination, a differential proteome analysis of primary equine Müller cells (eqMC) and immortalized human Müller cells (MIO-M1 cells) was carried out after *in vitro* stimulation with LPS. Proteins of the cell membrane are of particular interest in immunology, but due to their poor solubility they are often underrepresented in mass spectrometry data sets, which is why a protocol for the enrichment of cell membrane proteins was chosen in this study. Label-free LC-MS/MS analysis of cell membrane proteins resulted in a total of 507

proteins in MIO-M1 cells, of which 18 were significantly more abundant after stimulation with LPS, while the cell membrane proteome of eqMC comprised 1425 proteins, with 79 more abundant proteins after LPS stimulation. Pathway enrichment analysis of the data set revealed not only cytokine signaling pathways and cell adhesion processes but also MHC class I and II mediated antigen presentation. Correspondingly, eqMC expressed both MHC class I and MHC class II molecules as well as the costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86. Furthermore, six proteins with higher abundance after treatment with LPS in both eqMC and MIO-M1 cells were identified, with association to cell adhesion and the interaction between T cells and antigen-presenting cells. These included the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and JAM2, a heavy chain of the MHC class I molecule and the costimulatory molecules CD82 and ICOSLG. Therefore, the in-depth proteomic characterization of activated Müller cells carried out in this study indicates an antigen-presenting function of Müller cells and builds the foundation for further research on the participation of Müller cells in the retinal immune response, inter alia in the context of the ERU. Future studies should use organotypic retinal explants and the co-incubation of Müller cells with uveitogenic T-cells to further elucidate the issues described in this study.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aebersold R., Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422:198-207.
- Aebersold R., Agar J. N., Amster I. J., Baker M. S., Bertozzi C. R., Boja E. S., Costello C. E., Cravatt B. F., Fenselau C., Garcia B. A., Ge Y., Gunawardena J., Hendrickson R. C., Hergenrother P. J., Huber C. G., Ivanov A. R., Jensen O. N., Jewett M. C., Kelleher N. L., Kiessling L. L., Krogan N. J., Larsen M. R., Loo J. A., Ogorzalek Loo R. R., Lundberg E., MacCoss M. J., Mallick P., Mootha V. K., Mrksich M., Muir T. W., Patrie S. M., Pesavento J. J., Pitteri S. J., Rodriguez H., Saghatelian A., Sandoval W., Schlüter H., Sechi S., Slavoff S. A., Smith L. M., Snyder M. P., Thomas P. M., Uhlén M., Van Eyk J. E., Vidal M., Walt D. R., White F. M., Williams E. R., Wohlschläger T., Wysocki V. H., Yates N. A., Young N. L., Zhang B. (2018) How many human proteoforms are there? *Nat Chem Biol*. 14:206-214.
- Alarautalahti V., Ragauskas S., Hakkarainen J. J., Uusitalo-Järvinen H., Uusitalo H., Hyttinen J., Kalesnykas G., Nymark S. (2019) Viability of Mouse Retinal Explant Cultures Assessed by Preservation of Functionality and Morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 60:1914-1927.
- Allendorf D. H., Franssen E. H., Brown G. C. (2020a) Lipopolysaccharide activates microglia via neuraminidase 1 desialylation of Toll-like Receptor 4. *J Neurochem*. 155:403-416.
- Allendorf D. H., Puigdellívol M., Brown G. C. (2020b) Activated microglia desialylate their surface, stimulating complement receptor 3-mediated phagocytosis of neurons. *Glia*. 68:989-998.
- Almeida J. G., Preto A. J., Koukos P. I., Bonvin A., Moreira I. S. (2017) Membrane proteins structures: A review on computational modeling tools. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1859:2021-2039.
- Almén M. S., Nordström K. J., Fredriksson R., Schiöth H. B. (2009) Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol*. 7:50.
- Amadi-Obi A., Yu C. R., Liu X., Mahdi R. M., Clarke G. L., Nussenblatt R. B., Gery I., Lee Y. S., Egwuagu C. E. (2007) TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med*. 13:711-718.
- Amith S. R., Jayanth P., Franchuk S., Finlay T., Seyrantepe V., Beyaert R., Pshezhetsky A. V., Szewczuk M. R. (2010) Neu1 desialylation of sialyl α -2,3-linked β -galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. *Cell Signal*. 22:314-324.
- Angata T., Varki A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev*. 102:439-469.

- Arato I., Milardi D., Giovagnoli S., Grande G., Bellucci C., Lilli C., Bartoli S., Corneli S., Mazzone P., Calvitti M., Baroni T., Calafiore R., Mancuso F., Luca G. (2020) In "Vitro" Lps-Stimulated Sertoli Cells Pre-Loaded With Microparticles: Intracellular Activation Pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 11:611932.
- Baralle F. E., Giudice J. (2017) Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18:437-451.
- Barfüßer C., Wiedemann C., Hoffmann A. L. C., Hirmer S., Deeg C. A. (2021) Altered Metabolic Phenotype of Immune Cells in a Spontaneous Autoimmune Uveitis Model. *Front Immunol*. 12:601619.
- Benque I. J., Xia P., Shannon R., Ng T. F., Taylor A. W. (2018) The Neuropeptides of Ocular Immune Privilege, α -MSH and NPY, Suppress Phagosome Maturation in Macrophages. *Immunohorizons*. 2:314-323.
- Beutler B., Rietschel E. T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 3:169-176.
- Biedermann B., Bringmann A., Reichenbach A. (2002) High-affinity GABA uptake in retinal glial (Müller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency. *Glia*. 39:217-228.
- Biedermann B., Bringmann A., Franze K., Faude F., Wiedemann P., Reichenbach A. (2004) GABA(A) receptors in Müller glial cells of the human retina. *Glia*. 46:302-310.
- Bignami A., Dahl D. (1979) The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res*. 28:63-69.
- Bludau I., Aebersold R. (2020) Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 21:327-340.
- Bludau I., Frank M., Dörig C., Cai Y., Heusel M., Rosenberger G., Picotti P., Collins B. C., Röst H., Aebersold R. (2021) Systematic detection of functional proteoform groups from bottom-up proteomic datasets. *Nat Commun*. 12:3810.
- Bonten E., van der Spoel A., Fornerod M., Grosveld G., d'Azzo A. (1996) Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. *Genes Dev*. 10:3156-3169.
- Boots A. M., Wimmers-Bertens A. J., Rijnders A. W. (1994) Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology*. 82:268-274.
- Bottini N., Firestein G. S. (2013) Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 9:24-33.
- Bringmann A., Reichenbach A., Wiedemann P. (2004) Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res*. 36:241-249.

- Bringmann A., Pannicke T., Grosche J., Francke M., Wiedemann P., Skatchkov S. N., Osborne N. N., Reichenbach A. (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 25:397-424.
- Bringmann A., Iandiev I., Pannicke T., Wurm A., Hollborn M., Wiedemann P., Osborne N. N., Reichenbach A. (2009a) Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res.* 28:423-451.
- Bringmann A., Pannicke T., Biedermann B., Francke M., Iandiev I., Grosche J., Wiedemann P., Albrecht J., Reichenbach A. (2009b) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int.* 54:143-160.
- Bringmann A., Wiedemann P. (2012) Müller Glial Cells in Retinal Disease. *Ophthalmologica.* 227:1-19.
- Bringmann A., Grosche A., Pannicke T., Reichenbach A. (2013) GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4:48.
- Bringmann A., Syrbe S., Görner K., Kacza J., Francke M., Wiedemann P., Reichenbach A. (2018) The primate fovea: Structure, function and development. *Prog Retin Eye Res.* 66:49-84.
- Broderick C., Duncan L., Taylor N., Dick A. D. (2000) IFN-gamma and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:2613-2622.
- Brown C. C., Rudensky A. Y. (2021) Conceiving the Inconceivable: The Function of Aire in Immune Tolerance to Peripheral Tissue-Restricted Antigens in the Thymus. *J Immunol.* 206:245-247.
- Burke J. M., Smith J. M. (1981) Retinal proliferation in response to vitreous hemoglobin or iron. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20:582-592.
- Camelo S., Kezic J., Shanley A., Rigby P., McMenamin P. G. (2006) Antigen from the anterior chamber of the eye travels in a soluble form to secondary lymphoid organs via lymphatic and vascular routes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:1039-1046.
- Campbell J. P., Zhang M., Hwang T. S., Bailey S. T., Wilson D. J., Jia Y., Huang D. (2017) Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci Rep.* 7:42201.
- Caspi R. R., Roberge F. G., Chan C. C., Wiggert B., Chader G. J., Rozenszajn L. A., Lando Z., Nussenblatt R. B. (1988) A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol.* 140:1490-1495.
- Caspi R. R., Roberge F. G. (1989) Glial cells as suppressor cells: Characterization of the inhibitory function. *Journal of Autoimmunity.* 2:709-722.

- Caspi R. R., Grubbs B. G., Chan C. C., Chader G. J., Wiggert B. (1992) Genetic control of susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the mouse model. Concomitant regulation by MHC and non-MHC genes. *J Immunol.* 148:2384-2389.
- Caspi R. R., Chan C. C., Fujino Y., Najafian F., Grover S., Hansen C. T., Wilder R. L. (1993) Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis. *J Neuroimmunol.* 47:177-188.
- Caspi R. R. (2003) Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 15:Unit 15.16.
- Caspi R. R. (2006) Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev.* 213:23-35.
- Caspi R. R. (2010) A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest.* 120:3073-3083.
- Chen J., Vistica B. P., Takase H., Ham D. I., Fariss R. N., Wawrousek E. F., Chan C. C., DeMartino J. A., Farber J. M., Gery I. (2004) A unique pattern of up- and down-regulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation-inducing Th1 cells. *Eur J Immunol.* 34:2885-2894.
- Chen J., Qian H., Horai R., Chan C. C., Falick Y., Caspi R. R. (2013) Comparative analysis of induced vs. spontaneous models of autoimmune uveitis targeting the interphotoreceptor retinoid binding protein. *PLoS One.* 8:e72161.
- Chen L., Flies D. B. (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 13:227-242.
- Chen N., Wu J., Wang J., Piri N., Chen F., Xiao T., Zhao Y., Sun D., Kaplan H. J., Shao H. (2021) Short chain fatty acids inhibit endotoxin-induced uveitis and inflammatory responses of retinal astrocytes. *Exp Eye Res.* 206:108520.
- Chen X., Qian W., Song Z., Li Q. X., Guo S. (2020) Authentication, characterization and contamination detection of cell lines, xenografts and organoids by barcode deep NGS sequencing. *NAR Genom Bioinform.* 2:lqaa060.
- Chong W. P., van Panhuys N., Chen J., Silver P. B., Jittayasothorn Y., Mattapallil M. J., Germain R. N., Caspi R. R. (2015) NK-DC crosstalk controls the auto-pathogenic Th17 response through an innate IFN- γ -IL-27 axis. *J Exp Med.* 212:1739-1752.
- Chu C. J., Gardner P. J., Copland D. A., Liyanage S. E., Gonzalez-Cordero A., Kleine Holthaus S. M., Luhmann U. F., Smith A. J., Ali R. R., Dick A. D. (2016) Multimodal analysis of ocular inflammation using the endotoxin-induced uveitis mouse model. *Dis Model Mech.* 9:473-481.
- Chu X. K., Chan C.-C. (2013) Sympathetic ophthalmia: to the twenty-first century and beyond. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection.* 3:49.

- Collins F. S., Lander E. S., Rogers J., Waterson R. H. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431:931-945.
- Conedera F. M., Pousa A. M. Q., Mercader N., Tschopp M., Enzmann V. (2019) Retinal microglia signaling affects Müller cell behavior in the zebrafish following laser injury induction. *Glia*. 67:1150-1166.
- Croft M., Bradley L. M., Swain S. L. (1994) Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol*. 152:2675-2685.
- Cross A. S., Sakarya S., Rifat S., Held T. K., Drysdale B. E., Grange P. A., Cassels F. J., Wang L. X., Stamatou N., Farese A., Casey D., Powell J., Bhattacharjee A. K., Kleinberg M., Goldblum S. E. (2003) Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem*. 278:4112-4120.
- D'Orazio T. J., Mayhew E., Niederkorn J. Y. (2001) Ocular immune privilege promoted by the presentation of peptide on tolerogenic B cells in the spleen. II. Evidence for presentation by Qa-1. *J Immunol*. 166:26-32.
- Dando S. J., Kazanis R., McMenamin P. G. (2021) Myeloid Cells in the Mouse Retina and Uveal Tract Respond Differently to Systemic Inflammatory Stimuli. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 62:10.
- de Kozak Y., Sakai J., Thillaye B., Faure J. P. (1981) S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. *Curr Eye Res*. 1:327-337.
- de Smet M. D., Dayan M., Nussenblatt R. B. (1998) A novel method for the determination of T-cell proliferative responses in patients with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 6:173-178.
- Deeg C. A., Kaspers B., Gerhards H., Thurau S. R., Wollanke B., Wildner G. (2001) Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42:393-398.
- Deeg C. A., Ehrenhofer M., Thurau S. R., Reese S., Wildner G., Kaspers B. (2002a) Immunopathology of Recurrent Uveitis in Spontaneously Diseased Horses. *Exp Eye Res*. 75:127-133.
- Deeg C. A., Thurau S. R., Gerhards H., Ehrenhofer M., Wildner G., Kaspers B. (2002b) Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol*. 32:2598-2606.
- Deeg C. A., Amann B., Raith A. J., Kaspers B. (2006a) Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47:652-656.
- Deeg C. A., Pompetzki D., Raith A. J., Hauck S. M., Amann B., Suppmann S., Goebel T. W., Olazabal U., Gerhards H., Reese S., Stangassinger M., Kaspers B., Ueffing M. (2006b) Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics*. 5:1462-1470.

- Deeg C. A., Altmann F., Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M., Ueffing M. (2007a) Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics*. 7:1540-1548.
- Deeg C. A., Hauck S. M., Amann B., Kremmer E., Stangassinger M., Ueffing M. (2007b) Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol*. 44:3291-3296.
- Deeg C. A., Raith A. J., Amann B., Crabb J. W., Thurau S. R., Hauck S. M., Ueffing M., Wildner G., Stangassinger M. (2007c) CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol*. 2007:39245.
- Deeg C. A., Eberhardt C., Hofmaier F., Amann B., Hauck S. M. (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:e27674.
- Deeg C. A., Amann B., Lutz K., Hirmer S., Lutterberg K., Kremmer E., Hauck S. M. (2016) Aquaporin 11, a regulator of water efflux at retinal Muller glial cell surface decreases concomitant with immune-mediated gliosis. *J Neuroinflammation*. 13:89.
- Degroote R. L., Hauck S. M., Amann B., Hirmer S., Ueffing M., Deeg C. A. (2014) Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis. *PLoS One*. 9:e91684.
- Degroote R. L., Uhl P. B., Amann B., Krackhardt A. M., Ueffing M., Hauck S. M., Deeg C. A. (2017) Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics*. 154:102-108.
- Degroote R. L., Weigand M., Hauck S. M., Deeg C. A. (2019) IL8 and PMA Trigger the Regulation of Different Biological Processes in Granulocyte Activation. *Front Immunol*. 10:3064.
- Degroote R. L., Deeg C. A. (2020) Immunological Insights in Equine Recurrent Uveitis. *Front Immunol*. 11:609855.
- den Haan J. M., Arens R., van Zelm M. C. (2014) The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett*. 162:103-112.
- DeVoss J., Hou Y., Johannes K., Lu W., Liou G. I., Rinn J., Chang H., Caspi R. R., Fong L., Anderson M. S. (2006) Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med*. 203:2727-2735.
- Dewispelaere R., Lipski D., Foucart V., Bruyns C., Frère A., Caspers L., Willermain F. (2015) ICAM-1 and VCAM-1 are differentially expressed on blood-retinal

- barrier cells during experimental autoimmune uveitis. *Exp Eye Res.* 137:94-102.
- Di Pierdomenico J., Martínez-Vacas A., Hernández-Muñoz D., Gómez-Ramírez A. M., Valiente-Soriano F. J., Agudo-Barriuso M., Vidal-Sanz M., Villegas-Pérez M. P., García-Ayuso D. (2020) Coordinated Intervention of Microglial and Müller Cells in Light-Induced Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 61:47.
- Diaz-Araya C. M., Provis J. M., Penfold P. L., Billson F. A. (1995) Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol.* 363:53-68.
- Díaz-Coránguez M., Ramos C., Antonetti D. A. (2017) The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Res.* 139:123-137.
- Dick A. D., Tundia N., Sorg R., Zhao C., Chao J., Joshi A., Skup M. (2016) Risk of Ocular Complications in Patients with Noninfectious Intermediate Uveitis, Posterior Uveitis, or Panuveitis. *Ophthalmology.* 123:655-662.
- Diedrichs-Möhring M., Kaufmann U., Wildner G. (2018) The immunopathogenesis of chronic and relapsing autoimmune uveitis - Lessons from experimental rat models. *Prog Retin Eye Res.* 65:107-126.
- Dierschke S. K., Toro A. L., Miller W. P., Sunilkumar S., Dennis M. D. (2020) Diabetes enhances translation of Cd40 mRNA in murine retinal Müller glia via a 4E-BP1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 295:10831-10841.
- Dmitriev A. V., Govardovskii V. I., Schwahn H. N., Steinberg R. H. (1999) Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation. *Vis Neurosci.* 16:1157-1167.
- Domon B., Aebersold R. (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 312:212-217.
- Drescher K. M., Whittum-Hudson J. A. (1996) Modulation of immune-associated surface markers and cytokine production by murine retinal glial cells. *J Neuroimmunol.* 64:71-81.
- Du L., Yip Y. W. Y., Ng H. K., Ho B. M., He J. N., Chan S. O., Pang C. P., Chu W. K. (2021) Ruxolitinib Alleviates Uveitis Caused by Salmonella typhimurium Endotoxin. *Microorganisms.* 9:1481.
- Dustin M. L., Springer T. A. (1989) T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* 341:619-624.
- Dyer M. A., Cepko C. L. (2000) Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci.* 3:873-880.
- Eastlake K., Banerjee P. J., Angbohang A., Charteris D. G., Khaw P. T., Limb G. A. (2016) Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia.* 64:495-506.

- Eastlake K., Heywood W. E., Banerjee P., Bliss E., Mills K., Khaw P. T., Charteris D., Limb G. A. (2018) Comparative proteomic analysis of normal and gliotic PVR retina and contribution of Müller glia to this profile. *Exp Eye Res.* 177:197-207.
- Eastlake K., Luis J., Limb G. A. (2020) Potential of Müller Glia for Retina Neuroprotection. *Curr Eye Res.* 45:339-348.
- Eastlake K., Lamb W. D. B., Luis J., Khaw P. T., Jayaram H., Limb G. A. (2021) Prospects for the application of Müller glia and their derivatives in retinal regenerative therapies. *Prog Retin Eye Res*:100970.
- Eberhardt C., Amann B., Feuchtinger A., Hauck S. M., Deeg C. A. (2011) Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Müller glial cell-dependent ion and water homeostasis. *Glia.* 59:697-707.
- Egwuagu C. E., Charukamnoetkanok P., Gery I. (1997) Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J Immunol.* 159:3109-3112.
- Ehrenhofer M. C. A., Deeg C. A., Reese S., Liebich H.-G., Stangassinger M., Kaspers B. (2002) Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol.* 5:39-47.
- Eichler W., Yafai Y., Keller T., Wiedemann P., Reichenbach A. (2004) PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res.* 299:68-78.
- EITanbouly M. A., Noelle R. J. (2021) Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nat Rev Immunol.* 21:257-267.
- Fan N. W., Li J., Mittal S. K., Foulsham W., Elbasiony E., Huckfeldt R. M., Chauhan S. K., Chen Y. (2021) Characterization of Clinical and Immune Responses in an Experimental Chronic Autoimmune Uveitis Model. *Am J Pathol.* 191:425-437.
- Faunce D. E., Sonoda K. H., Stein-Streilein J. (2001) MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J Immunol.* 166:313-321.
- Fearon D. T. (1978) Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:1971-1975.
- Feng C., Zhang L., Almulki L., Faez S., Whitford M., Hafezi-Moghadam A., Cross A. S. (2011) Endogenous PMN sialidase activity exposes activation epitope on CD11b/CD18 which enhances its binding interaction with ICAM-1. *J Leukoc Biol.* 90:313-321.
- Feng Y., Mei L., Wang M., Huang Q., Huang R. (2021) Anti-inflammatory and Pro-apoptotic Effects of 18beta-Glycyrrhetic Acid In Vitro and In Vivo Models of Rheumatoid Arthritis. *Front Pharmacol.* 12:681525.

- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246:64-71.
- Ferguson T. A., Griffith T. S. (2006) A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunol Rev*. 213:228-238.
- Fields M. A., Del Priore L. V., Adelman R. A., Rizzolo L. J. (2020) Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal-barrier. *Prog Retin Eye Res*. 76:100803.
- Fingerhut L., Ohnesorge B., von Borstel M., Schumski A., Strutzberg-Minder K., Mörgelin M., Deeg C. A., Haagsman H. P., Beineke A., von Köckritz-Blickwede M., de Buhr N. (2019) Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis (ERU). *Cells*. 8:1528.
- Fischer B. M., McMullen R. J., Jr., Reese S., Brehm W. (2019) Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results. *BMC Vet Res*. 15:29.
- Fontainhas A. M., Wang M., Liang K. J., Chen S., Mettu P., Damani M., Fariss R. N., Li W., Wong W. T. (2011) Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One*. 6:e15973.
- Forrester J. V. (1991) Uveitis: pathogenesis. *Lancet*. 338:1498-1501.
- Franze K., Grosche J., Skatchkov S. N., Schinkinger S., Foja C., Schild D., Uckermann O., Travis K., Reichenbach A., Guck J. (2007) Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:8287-8292.
- Franze K., Gerdemann J., Weick M., Betz T., Pawlizak S., Lakadamyali M., Bayer J., Rillich K., Gögler M., Lu Y. B., Reichenbach A., Janmey P., Käs J. (2009) Neurite branch retraction is caused by a threshold-dependent mechanical impact. *Biophys J*. 97:1883-1890.
- Fu X., Chen Y., Chen D. (2021) The Role of Gut Microbiome in Autoimmune Uveitis. *Ophthalmic Res*. 64:168-177.
- Gallorini M., Rapino M., Schweikl H., Cataldi A., Amoroso R., Maccallini C. (2021) Selective Inhibitors of the Inducible Nitric Oxide Synthase as Modulators of Cell Responses in LPS-Stimulated Human Monocytes. *Molecules*. 26:4419.
- Gao S., Cheng Q. C., Hu Y. G., Tan Z. Z., Chen L., Liu S. W., Kang Q. Y., Wei T. (2021) LncRNA AK148321 alleviates neuroinflammation in LPS-stimulated BV2 microglial cell through regulating microRNA-1199-5p/HSPA5 axis. *Life Sci*. 266:118863.
- Ge S. X., Jung D., Yao R. (2020) ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. 36:2628-2629.

- Gerding J. C., Gilger B. C. (2016) Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Vet J.* 48:290-298.
- Gery I., Wiggert B., Redmond T. M., Kuwabara T., Crawford M. A., Vistica B. P., Chader G. J. (1986) Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27:1296-1300.
- Gery I., Caspi R. R. (2018) Tolerance Induction in Relation to the Eye. *Front Immunol.* 9:2304.
- Gilger B. C., Malok E., Cutter K. V., Stewart T., Horohov D. W., Allen J. B. (1999) Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 71:17-28.
- Gilger B. C., Michau T. M. (2004) Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 20:417-427.
- Gilger B. C. (2010) Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA. *Equine Vet J Suppl.* 37:57-61.
- Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M. F., Conway S. J., Ng L. G., Stanley E. R., Samokhvalov I. M., Merad M. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 330:841-845.
- Graessel A., Hauck S. M., von Toerne C., Kloppmann E., Goldberg T., Koppensteiner H., Schindler M., Knapp B., Krause L., Dietz K., Schmidt-Weber C. B., Suttner K. (2015) A Combined Omics Approach to Generate the Surface Atlas of Human Naive CD4+ T Cells during Early T-Cell Receptor Activation. *Mol Cell Proteomics.* 14:2085-2102.
- Grakoui A., Bromley S. K., Sumen C., Davis M. M., Shaw A. S., Allen P. M., Dustin M. L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 285:221-227.
- Grosche A., Hauser A., Lepper M. F., Mayo R., von Toerne C., Merl-Pham J., Hauck S. M. (2016) The Proteome of Native Adult Müller Glial Cells From Murine Retina. *Mol Cell Proteomics.* 15:462-480.
- Gu R., Ding X., Tang W., Lei B., Jiang C., Xu G. (2018) A Synthesized Glucocorticoid- Induced Leucine Zipper Peptide Inhibits Retinal Müller Cell Gliosis. *Front Pharmacol.* 9:00331.
- Guo Y., Cang X., Zhu L., Zhu M., Li A., Wang Z., Zhang Y., Wang X., Song E. (2021) PPP1CA/YAP/GS/Gln/mTORC1 pathway activates retinal Müller cells during diabetic retinopathy. *Exp Eye Res.* 210:108703.
- Harduin-Lepers A., Vallejo-Ruiz V., Krzewinski-Recchi M.-A., Samyn-Petit B., Julien S., Delannoy P. (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie.* 83:727-737.

- Hauck S. M., Suppmann S., Ueffing M. (2003) Proteomic profiling of primary retinal Müller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. *Glia*. 44:251-263.
- Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M., Gerhards H., Ueffing M., Deeg C. A. (2007) Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res*. 6:2121-2131.
- Hauck S. M., Dietter J., Kramer R. L., Hofmaier F., Zipplies J. K., Amann B., Feuchtinger A., Deeg C. A., Ueffing M. (2010) Deciphering Membrane-Associated Molecular Processes in Target Tissue of Autoimmune Uveitis by Label-Free Quantitative Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 9:2292-2305.
- Hauck S. M., Lepper M. F., Hertl M., Sekundo W., Deeg C. A. (2017) Proteome Dynamics in Biobanked Horse Peripheral Blood Derived Lymphocytes (PBL) with Induced Autoimmune Uveitis. *Proteomics*. 17:00013.
- Heissigerova J., Seidler Stangova P., Klimova A., Svozilkova P., Hrcir T., Stepankova R., Kverka M., Tlaskalova-Hogenova H., Forrester J. V. (2016) The Microbiota Determines Susceptibility to Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *J Immunol Res*. 2016:5065703.
- Heng J. S., Hackett S. F., Stein-O'Brien G. L., Winer B. L., Williams J., Goff L. A., Nathans J. (2019) Comprehensive analysis of a mouse model of spontaneous uveoretinitis using single-cell RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116:26734-26744.
- Heslop J. A., Rowe C., Walsh J., Sison-Young R., Jenkins R., Kamalian L., Kia R., Hay D., Jones R. P., Malik H. Z., Fenwick S., Chadwick A. E., Mills J., Kitteringham N. R., Goldring C. E., Kevin Park B. (2017) Mechanistic evaluation of primary human hepatocyte culture using global proteomic analysis reveals a selective dedifferentiation profile. *Arch Toxicol*. 91:439-452.
- Heuberger C., Pott J., Maloy K. J. (2021) Why do intestinal epithelial cells express MHC class II? *Immunology*. 162:357-367.
- Higgs M. H., Lukasiewicz P. D. (1999) Glutamate uptake limits synaptic excitation of retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 19:3691-3700.
- Hollborn M., Ulbricht E., Rillich K., Dukic-Stefanovic S., Wurm A., Wagner L., Reichenbach A., Wiedemann P., Limb G. A., Bringmann A., Kohen L. (2011) The human Müller cell line MIO-M1 expresses opsins. *Mol Vis*. 17:2738-2750.
- Horai R., Caspi R. R. (2019) Microbiome and Autoimmune Uveitis. *Frontiers in Immunology*. 10:232.
- Hu X., Xu M. X., Zhou H., Cheng S., Li F., Miao Y., Wang Z. (2020) Tumor necrosis factor-alpha aggravates gliosis and inflammation of activated retinal Müller cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 531:383-389.

- Irie A., Koyama S., Kozutsumi Y., Kawasaki T., Suzuki A. (1998) The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem.* 273:15866-15871.
- Izumi Y., Shimamoto K., Benz A. M., Hammerman S. B., Olney J. W., Zorumski C. F. (2002) Glutamate transporters and retinal excitotoxicity. *Glia.* 39:58-68.
- Janowitz C., Nakamura Y. K., Metea C., Gligor A., Yu W., Karstens L., Rosenbaum J. T., Asquith M., Lin P. (2019) Disruption of Intestinal Homeostasis and Intestinal Microbiota During Experimental Autoimmune Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 60:420-429.
- Jassal B., Matthews L., Viteri G., Gong C., Lorente P., Fabregat A., Sidiropoulos K., Cook J., Gillespie M., Haw R., Loney F., May B., Milacic M., Rothfels K., Sevilla C., Shamovsky V., Shorsler S., Varusai T., Weiser J., Wu G., Stein L., Hermjakob H., D'Eustachio P. (2020) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 48:D498-d503.
- Jiang L., He H., Yang P., Lin X., Zhou H., Huang X., Kijlstra A. (2009) Splenic CD8+ T cells secrete TGF-beta1 to exert suppression in mice with anterior chamber-associated immune deviation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 247:87-92.
- Kalloniatis M., Napper G. A. (2002) Retinal neurochemical changes following application of glutamate as a metabolic substrate. *Clin Exp Optom.* 85:27-36.
- Kalsow C. M., Dwyer A. E. (1998) Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 6:239-251.
- Kalxdorf M., Gade S., Eberl H. C., Bantscheff M. (2017) Monitoring Cell-surface N-Glycoproteome Dynamics by Quantitative Proteomics Reveals Mechanistic Insights into Macrophage Differentiation. *Mol Cell Proteomics.* 16:770-785.
- Kambayashi T., Laufer T. M. (2014) Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol.* 14:719-730.
- Kaplan H. J., Streilein J. W., Stevens T. R. (1975) Transplantation immunology of the anterior chamber of the eye. II. Immune response to allogeneic cells. *J Immunol.* 115:805-810.
- Kaplan H. J., Streilein J. W. (1977) Immune response to immunization via the anterior chamber of the eye. I. F. lymphocyte-induced immune deviation. *J Immunol.* 118:809-814.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 60:2299-2301.
- Karmakar J., Mandal C. (2021) Interplay Between Sialic Acids, Siglec-E, and Neu1 Regulates MyD88- and TRIF-Dependent Pathways for TLR4-Activation During *Leishmania donovani* Infection. *Front Immunol.* 12:626110.

- Karwoski C. J., Lu H. K., Newman E. A. (1989) Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science*. 244:578-580.
- Katoozi S., Rao S. B., Skauli N., Froehner S. C., Ottersen O. P., Adams M. E., Amiry-Moghaddam M. (2020) Functional specialization of retinal Müller cell endfeet depends on an interplay between two syntrophin isoforms. *Mol Brain*. 13:40.
- Kerr E. C., Copland D. A., Dick A. D., Nicholson L. B. (2008) The dynamics of leukocyte infiltration in experimental autoimmune uveoretinitis. *Prog Retin Eye Res*. 27:527-535.
- Kim M. K., Chan C. C., Belfort R., Jr., Farah M., Burnier M. P., Nussenblatt R. B., Kuwabara T., Palestine A. G. (1987) Histopathologic and immunohistopathologic features of subretinal fibrosis and uveitis syndrome. *Am J Ophthalmol*. 104:15-23.
- Kinuthia U. M., Wolf A., Langmann T. (2020) Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*. 11:564077.
- Klaska I. P., Muckersie E., Martin-Granados C., Christofi M., Forrester J. V. (2017) Lipopolysaccharide-primed heterotolerant dendritic cells suppress experimental autoimmune uveoretinitis by multiple mechanisms. *Immunology*. 150:364-377.
- Klaus C., Liao H., Allendorf D. H., Brown G. C., Neumann H. (2021) Sialylation acts as a checkpoint for innate immune responses in the central nervous system. *Glia*. 69:1619-1636.
- Kleinwort K. J., Amann B., Hauck S. M., Feederle R., Sekundo W., Deeg C. A. (2016) Immunological Characterization of Intraocular Lymphoid Follicles in a Spontaneous Recurrent Uveitis Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 57:4504-4511.
- Kleinwort K. J. H., Hauck S. M., Degroote R. L., Scholz A. M., Hölzel C., Maertlbauer E. P., Deeg C. (2019) Peripheral blood bovine lymphocytes and MAP show distinctly different proteome changes and immune pathways in host-pathogen interaction. *PeerJ*. 7:e8130.
- Kofuji P., Ceelen P., Zahs K. R., Surbeck L. W., Lester H. A., Newman E. A. (2000) Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci*. 20:5733-5740.
- Kofuji P., Biedermann B., Siddharthan V., Raap M., Iandiev I., Milenkovic I., Thomzig A., Veh R. W., Bringmann A., Reichenbach A. (2002) Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia*. 39:292-303.
- Koh K. H., Cao Y., Mangos S., Tardi N. J., Dande R. R., Lee H. W., Samelko B., Altintas M. M., Schmitz V. P., Lee H., Mukherjee K., Peev V., Cimbaluk D. J., Reiser J., Hahm E. (2019) Nonimmune cell-derived ICOS ligand functions as

- a renoprotective $\alpha\beta 3$ integrin-selective antagonist. *J Clin Invest.* 129:1713-1726.
- Kovaleva M., Johnson K., Steven J., Barelle C. J., Porter A. (2017) Therapeutic Potential of Shark Anti-ICOSL VNAR Domains is Exemplified in a Murine Model of Autoimmune Non-Infectious Uveitis. *Front Immunol.* 8:1121.
- Krishnamoorthy R. R., Clark A. F., Daudt D., Vishwanatha J. K., Yorio T. (2013) A forensic path to RGC-5 cell line identification: lessons learned. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:5712-5719.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305:567-580.
- Kumar A., Shamsuddin N. (2012) Retinal Muller Glia Initiate Innate Response to Infectious Stimuli via Toll-Like Receptor Signaling. *PLOS ONE.* 7:e29830.
- Kuwabara T., Cogan D. G. (1961) Retinal glycogen. *Arch Ophthalmol.* 66:680-688.
- Läubli H., Varki A. (2020) Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) detect self-associated molecular patterns to regulate immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 77:593-605.
- Lawrence J. M., Singhal S., Bhatia B., Keegan D. J., Reh T. A., Luthert P. J., Khaw P. T., Limb G. A. (2007) MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells.* 25:2033-2043.
- Le Y. Z., Xu B., Chucair-Elliott A. J., Zhang H., Zhu M. (2021) VEGF Mediates Retinal Müller Cell Viability and Neuroprotection through BDNF in Diabetes. *Biomolecules.* 11:712.
- Lee D. J., Taylor A. W. (2015) Recovery from experimental autoimmune uveitis promotes induction of antiuveitic inducible Tregs. *J Leukoc Biol.* 97:1101-1109.
- Lee E. J., Zheng M., Craft C. M., Jeong S. (2021) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) are localized in the nucleus of retinal Müller glial cells and modulated by cytokines and oxidative stress. *PLoS One.* 16:e0253915.
- Lee J. E., Liang K. J., Fariss R. N., Wong W. T. (2008) Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49:4169-4176.
- Lehmann U., Heuss N. D., McPherson S. W., Roehrich H., Gregerson D. S. (2010) Dendritic cells are early responders to retinal injury. *Neurobiol Dis.* 40:177-184.

- Lewis G. P., Fisher S. K. (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol.* 230:263-290.
- Li J., Patil R. V., Verkman A. S. (2002) Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Müller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:573-579.
- Li M., Dolz-Marco R., Messinger J. D., Ferrara D., Freund K. B., Curcio C. A. (2021a) Neurodegeneration, gliosis, and resolution of haemorrhage in neovascular age-related macular degeneration, a clinicopathologic correlation. *Eye (Lond).* 35:548-558.
- Li X., Yu Z. W., Li H. Y., Yuan Y., Gao X. Y., Kuang H. Y. (2021b) Retinal microglia polarization in diabetic retinopathy. *Vis Neurosci.* 38:E006.
- Liberto C. M., Albrecht P. J., Herx L. M., Yong V. W., Levison S. W. (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 89:1092-1100.
- Limb G. A., Salt T. E., Munro P. M., Moss S. E., Khaw P. T. (2002) In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:864-869.
- Lin A., Loré K. (2017) Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. *Front Immunol.* 8:1781.
- Lin H. H., Faunce D. E., Stacey M., Terajewicz A., Nakamura T., Zhang-Hoover J., Kerley M., Mucenski M. L., Gordon S., Stein-Streilein J. (2005) The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med.* 201:1615-1625.
- Lindsay K. J., Du J., Sloat S. R., Contreras L., Linton J. D., Turner S. J., Sadilek M., Satrustegui J., Hurley J. B. (2014) Pyruvate kinase and aspartate-glutamate carrier distributions reveal key metabolic links between neurons and glia in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:15579-15584.
- Lipski D. A., Dewispelaere R., Foucart V., Caspers L. E., Defrance M., Bruyns C., Willermain F. (2017) MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis. *J Neuroinflammation.* 14:136.
- Liu Y., Li L., Pan N., Gu J., Qiu Z., Cao G., Dou Y., Dong L., Shuai J., Sang A. (2021) TNF- α released from retinal Müller cells aggravates retinal pigment epithelium cell apoptosis by upregulating mitophagy during diabetic retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 561:143-150.
- Liu Y. H., Mölzer C., Makinen K., Kamoi K., Corbett C. L. C., Klaska I. P., Reid D. M., Wilson H. M., Kuffová L., Cornall R. J., Forrester J. V. (2020) Treatment With FoxP3+ Antigen-Experienced T Regulatory Cells Arrests Progressive Retinal Damage in a Spontaneous Model of Uveitis. *Front Immunol.* 11:2071.

- Lorenzo C., Delgado P., Busse C. E., Sanz-Bravo A., Martos-Folgado I., Bonzon-Kulichenko E., Ferrarini A., Gonzalez-Valdes I. B., Mur S. M., Roldán-Montero R., Martínez-Lopez D., Martín-Ventura J. L., Vázquez J., Wardemann H., Ramiro A. R. (2021) ALDH4A1 is an atherosclerosis auto-antigen targeted by protective antibodies. *Nature*. 589:287-292.
- Lu Y. B., Franze K., Seifert G., Steinhäuser C., Kirchhoff F., Wolburg H., Guck J., Janmey P., Wei E. Q., Käs J., Reichenbach A. (2006) Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:17759-17764.
- Lu Y. B., Iandiev I., Hollborn M., Körber N., Ulbricht E., Hirrlinger P. G., Pannicke T., Wei E. Q., Bringmann A., Wolburg H., Wilhelmsson U., Pekny M., Wiedemann P., Reichenbach A., Käs J. A. (2011) Reactive glial cells: increased stiffness correlates with increased intermediate filament expression. *Faseb j*. 25:624-631.
- Lübbbers J., Rodríguez E., van Kooyk Y. (2018) Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Front Immunol*. 9:2807.
- Luo C., Chen M., Xu H. (2011) Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. *Mol Vis*. 17:1588-1597.
- Mahajan V. S., Pillai S. (2016) Sialic acids and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 269:145-161.
- Mano T., Tokuda N., Puro D. G. (1991) Interferon-gamma induces the expression of major histocompatibility antigens by human retinal glial cells. *Exp Eye Res*. 53:603-607.
- Masters J. R., Thomson J. A., Daly-Burns B., Reid Y. A., Dirks W. G., Packer P., Toji L. H., Ohno T., Tanabe H., Arlett C. F., Kelland L. R., Harrison M., Virmani A., Ward T. H., Ayres K. L., Debenham P. G. (2001) Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8012-8017.
- Matsui K., Hosoi N., Tachibana M. (1999) Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci*. 19:6755-6766.
- Matta C., Boocock D. J., Fellows C. R., Miosge N., Dixon J. E., Liddell S., Smith J., Mobasher A. (2019) Molecular phenotyping of the surfaceome of migratory chondroprogenitors and mesenchymal stem cells using biotinylation, glyco-capture and quantitative LC-MS/MS proteomic analysis. *Sci Rep*. 9:9018.
- McMullen R. J., Jr., Fischer B. M. (2017) Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 33:465-481.
- Medawar P. B. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*. 29:58-69.

- Mehrfeld C., Zenner S., Kornek M., Lukacs-Kornek V. (2018) The Contribution of Non-Professional Antigen-Presenting Cells to Immunity and Tolerance in the Liver. *Front Immunol.* 9:635.
- Mendes-Jorge L., Ramos D., Luppó M., Llombart C., Alexandre-Pires G., Nacher V., Melgarejo V., Correia M., Navarro M., Carretero A., Tafuro S., Rodriguez-Baeza A., Esperança-Pina J. A., Bosch F., Ruberte J. (2009) Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:5997-6005.
- Meri S., Pangburn M. K. (1990) Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3982-3986.
- Metaa M. R., Newman E. A. (2006) Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci.* 26:2862-2870.
- Michael M., Parsons M. (2020) New perspectives on integrin-dependent adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 63:31-37.
- Mir F. A., Contreras-Ruiz L., Masli S. (2015) Thrombospondin-1-dependent immune regulation by transforming growth factor- β 2-exposed antigen-presenting cells. *Immunology.* 146:547-556.
- Miserocchi E., Fogliato G., Modorati G., Bandello F. (2013) Review on the Worldwide Epidemiology of Uveitis. *European Journal of Ophthalmology.* 23:705-717.
- Miyagi T., Yamaguchi K. (2012) Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology.* 22:880-896.
- Moore K. L., Stults N. L., Diaz S., Smith D. F., Cummings R. D., Varki A., McEver R. P. (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol.* 118:445-456.
- Muchmore E. A., Diaz S., Varki A. (1998) A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *Am J Phys Anthropol.* 107:187-198.
- Müller H. (1851) Zur histologie der netzhaut. *Z Wiss Zool.* 3:234-237.
- Nagelhus E. A., Horio Y., Inanobe A., Fujita A., Haug F. M., Nielsen S., Kurachi Y., Ottersen O. P. (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia.* 26:47-54.
- Nakamura Y. K., Metaa C., Karstens L., Asquith M., Gruner H., Moscibrocki C., Lee I., Brislawn C. J., Jansson J. K., Rosenbaum J. T., Lin P. (2016) Gut Microbial Alterations Associated With Protection From Autoimmune Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57:3747-3758.

- Nakazawa T., Hisatomi T., Nakazawa C., Noda K., Maruyama K., She H., Matsubara A., Miyahara S., Nakao S., Yin Y., Benowitz L., Hafezi-Moghadam A., Miller J. W. (2007) Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:2425-2430.
- Natoli R., Fernando N., Madigan M., Chu-Tan J. A., Valter K., Provis J., Rutar M. (2017) Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Mol Neurodegener*. 12:31.
- Natori Y., Nasui M., Edo K., Sato S., Sakurai T., Kizaki T., Kihara-Negishi F. (2017) NEU1 sialidase controls gene expression and secretion of IL-6 and MCP-1 through NF- κ B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biochemistry*. 162:137-143.
- Neefjes J., Jongstra M. L., Paul P., Bakke O. (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 11:823-836.
- Neelam S., Mellon J., Wilkerson A., Niederkorn J. Y. (2018) Induction of Contrasuppressor Cells and Loss of Immune Privilege Produced by Corneal Nerve Ablation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 59:4738-4747.
- Netti V., Pizzoni A., Pérez-Domínguez M., Ford P., Pasantes-Morales H., Ramos-Mandujano G., Capurro C. (2018) Release of taurine and glutamate contributes to cell volume regulation in human retinal Müller cells: differences in modulation by calcium. *J Neurophysiol*. 120:973-984.
- Newman E., Reichenbach A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 19:307-312.
- Newman E. A., Frambach D. A., Odette L. L. (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science*. 225:1174-1175.
- Newman E. A. (1985) Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature*. 317:809-811.
- Newman E. A. (1993) Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci*. 13:3333-3345.
- Newman E. A. (1994) A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia*. 11:291-299.
- Newman E. A. (2015) Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 370:20140195.
- Ng S. K., Wood J. P., Chidlow G., Han G., Kittipassorn T., Peet D. J., Casson R. J. (2015) Cancer-like metabolism of the mammalian retina. *Clin Exp Ophthalmol*. 43:367-376.

- Nieder Korn J. Y., Streilein J. W. (1983) Alloantigens placed into the anterior chamber of the eye induce specific suppression of delayed-type hypersensitivity but normal cytotoxic T lymphocyte and helper T lymphocyte responses. *J Immunol.* 131:2670-2674.
- Nieder Korn J. Y. (2019) The Eye Sees Eye to Eye With the Immune System: The 2019 Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 60:4489-4495.
- Nieder Korn J. Y. (2021) "Corneal Nerves, CD11c(+) Dendritic Cells and Their Impact on Ocular Immune Privilege". *Front Immunol.* 12:701935.
- Oh K., Byoun O. J., Ham D. I., Kim Y. S., Lee D. S. (2011) Invariant NKT cells regulate experimental autoimmune uveitis through inhibition of Th17 differentiation. *Eur J Immunol.* 41:392-402.
- Okunuki Y., Mukai R., Nakao T., Tabor S. J., Butovsky O., Dana R., Ksander B. R., Connor K. M. (2019) Retinal microglia initiate neuroinflammation in ocular autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116:9989-9998.
- Ola M. S., Hosoya K., LaNoue K. F. (2011) Regulation of glutamate metabolism by hydrocortisone and branched chain keto acids in cultured rat retinal Müller cells (TR-MUL). *Neurochem Int.* 59:656-663.
- Omenetti S., Pizarro T. T. (2015) The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol.* 6:639.
- Ong S. E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 1:376-386.
- Pan C., Kumar C., Bohl S., Klingmueller U., Mann M. (2009) Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics.* 8:443-450.
- Paunicka K., Chen P. W., Nieder Korn J. Y. (2012) Role of IFN- γ in the establishment of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)-induced CD8⁺ T regulatory cells. *J Leukoc Biol.* 91:475-483.
- Paunicka K. J., Mellon J., Robertson D., Petroll M., Brown J. R., Nieder Korn J. Y. (2015) Severing corneal nerves in one eye induces sympathetic loss of immune privilege and promotes rejection of future corneal allografts placed in either eye. *Am J Transplant.* 15:1490-1501.
- Pauwels J., Fijałkowska D., Eyckerman S., Gevaert K. (2021) Mass spectrometry and the cellular surfaceome. *Mass Spectrom Rev.* 21690.
- Pereiro X., Miltner A. M., La Torre A., Vecino E. (2020) Effects of Adult Müller Cells and Their Conditioned Media on the Survival of Stem Cell-Derived Retinal Ganglion Cells. *Cells.* 9:1759.

- Pérezleón J. A., Osorio-Paz I., Francois L., Salceda R. (2013) Immunohistochemical localization of glycogen synthase and GSK3 β : control of glycogen content in retina. *Neurochem Res.* 38:1063-1069.
- Pfeiffer-Guglielmi B., Francke M., Reichenbach A., Fleckenstein B., Jung G., Hamprecht B. (2005) Glycogen phosphorylase isozyme pattern in mammalian retinal Müller (glial) cells and in astrocytes of retina and optic nerve. *Glia.* 49:84-95.
- Poitry-Yamate C. L., Poitry S., Tsacopoulos M. (1995) Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci.* 15:5179-5191.
- Poitry S., Poitry-Yamate C., Ueberfeld J., MacLeish P. R., Tsacopoulos M. (2000) Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci.* 20:1809-1821.
- Portillo J. C., Lopez Corcino Y., Miao Y., Tang J., Sheibani N., Kern T. S., Dubyak G. R., Subauste C. S. (2017) CD40 in Retinal Müller Cells Induces P2X7-Dependent Cytokine Expression in Macrophages/Microglia in Diabetic Mice and Development of Early Experimental Diabetic Retinopathy. *Diabetes.* 66:483-493.
- Pow D. V., Crook D. K. (1995) Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. *Neurosci Lett.* 193:25-28.
- Pow D. V., Crook D. K. (1996) Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience.* 70:295-302.
- Prendergast R. A., Iloff C. E., Coskuncan N. M., Caspi R. R., Sartani G., Tarrant T. K., Luty G. A., McLeod D. S. (1998) T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:754-762.
- Puigdemívol M., Allendorf D. H., Brown G. C. (2020) Sialylation and Galectin-3 in Microglia-Mediated Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 14:00162.
- Qian X., Agematsu K., Freeman G. J., Tagawa Y., Sugane K., Hayashi T. (2006) The ICOS-ligand B7-H2, expressed on human type II alveolar epithelial cells, plays a role in the pulmonary host defense system. *Eur J Immunol.* 36:906-918.
- Qiu R., Yang M., Wang W., Liu J., Yang L., Lei B. (2021) The Protective Effects of VVN001 on LPS-Induced Inflammatory Responses in Human RPE Cells and in a Mouse Model of EIU. *Inflammation.* 44:780-794.
- Rathnasamy G., Foulds W. S., Ling E. A., Kaur C. (2019) Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Prog Neurobiol.* 173:18-40.

- Rauen T., Wiessner M. (2000) Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochem Int.* 37:179-189.
- Reichelt W., Stabel-Burow J., Pannicke T., Weichert H., Heinemann U. (1997) The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience.* 77:1213-1224.
- Reichenbach A., Henke A., Eberhardt W., Reichelt W., Dettmer D. (1992) K⁺ ion regulation in retina. *Can J Physiol Pharmacol.* 70 Suppl:S239-247.
- Reichenbach A., Stolzenburg J. U., Eberhardt W., Chao T. I., Dettmer D., Hertz L. (1993) What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 6:201-213.
- Reichenbach A., Robinson S. R. (1995) Phylogenetic constraints on retinal organisation and development. *Prog Retin Eye Res.* 15:139-171.
- Reichenbach A., Bringmann A. (2013) New functions of Müller cells. *Glia.* 61:651-678.
- Reichenbach A., Bringmann A. (2016) Role of Purines in Müller Glia. *J Ocul Pharmacol Ther.* 32:518-533.
- Reichenbach A., Bringmann A. (2020) Glia of the human retina. *Glia.* 68:768-796.
- Rezzola S., Guerra J., Krishna Chandran A. M., Loda A., Cancarini A., Sacristani P., Semeraro F., Presta M. (2021) VEGF-Independent Activation of Müller Cells by the Vitreous from Proliferative Diabetic Retinopathy Patients. *Int J Mol Sci.* 22:2179.
- Riepe R. E., Norenburg M. D. (1977) Müller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature.* 268:654-655.
- Roberge F. G., Caspi R. R., Nussenblatt R. B. (1988) Glial retinal Müller cells produce IL-1 activity and have a dual effect on autoimmune T helper lymphocytes. Antigen presentation manifested after removal of suppressive activity. *J Immunol.* 140:2193-2196.
- Rockwell H., Mack M., Famula T., Sandmeyer L., Bauer B., Dwyer A., Lassaline M., Beeson S., Archer S., McCue M., Bellone R. R. (2020) Genetic investigation of equine recurrent uveitis in Appaloosa horses. *Anim Genet.* 51:111-116.
- Romeike A., Brüggmann M., Drommer W. (1998) Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol.* 35:515-526.
- Rosen S. D., Singer M. S., Yednock T. A., Stoolman L. M. (1985) Involvement of sialic acid on endothelial cells in organ-specific lymphocyte recirculation. *Science.* 228:1005-1007.
- Rosenbaum J. T., McDevitt H. O., Guss R. B., Egbert P. R. (1980) Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature.* 286:611-613.

- Rosenbaum J. T., Lin P., Asquith M. (2016) The microbiome, HLA, and the pathogenesis of uveitis. *Jpn J Ophthalmol.* 60:1-6.
- Rueda E. M., Johnson J. E., Jr., Giddabasappa A., Swaroop A., Brooks M. J., Sigel I., Chaney S. Y., Fox D. A. (2016) The cellular and compartmental profile of mouse retinal glycolysis, tricarboxylic acid cycle, oxidative phosphorylation, and ~P transferring kinases. *Mol Vis.* 22:847-885.
- Rutar M., Natoli R., Chia R. X., Valter K., Provis J. M. (2015) Chemokine-mediated inflammation in the degenerating retina is coordinated by Müller cells, activated microglia, and retinal pigment epithelium. *J Neuroinflammation.* 12:8.
- Ruzafa N., Pereiro X., Lepper M. F., Hauck S. M., Vecino E. (2018) A Proteomics Approach to Identify Candidate Proteins Secreted by Müller Glia that Protect Ganglion Cells in the Retina. *Proteomics.* 18:1700321.
- Sagmeister S., Merl-Pham J., Petrera A., Deeg C. A., Hauck S. M. (2021) High glucose treatment promotes extracellular matrix proteome remodeling in Müller glial cells. *PeerJ.* 9:e11316.
- Sakami S., Imanishi Y., Palczewski K. (2019) Müller glia phagocytose dead photoreceptor cells in a mouse model of retinal degenerative disease. *FASEB J.* 33:3680-3692.
- Sakarya S., Rifat S., Zhou J., Bannerman D. D., Stamatou N. M., Cross A. S., Goldblum S. E. (2004) Mobilization of neutrophil sialidase activity desialylates the pulmonary vascular endothelial surface and increases resting neutrophil adhesion to and migration across the endothelium. *Glycobiology.* 14:481-494.
- Saldinger L. K., Nelson S. G., Bellone R. R., Lassaline M., Mack M., Walker N. J., Borjesson D. L. (2020) Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro. *Vet Ophthalmol.* 23:160-170.
- Santos R., Ursu O., Gaulton A., Bento A. P., Donadi R. S., Bologa C. G., Karlsson A., Al-Lazikani B., Hersey A., Oprea T. I., Overington J. P. (2017) A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 16:19-34.
- Schnichels S., Paquet-Durand F., Löscher M., Tsai T., Hurst J., Joachim S. C., Klettner A. (2021) Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina. *Prog Retin Eye Res.* 81:100880.
- Schnitzer J. (1988) Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia.* 1:74-89.
- Schütte M., Werner P. (1998) Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett.* 246:53-56.

- Shahulhameed S., Vishwakarma S., Chhablani J., Tyagi M., Pappuru R. R., Jakati S., Chakrabarti S., Kaur I. (2020) A Systematic Investigation on Complement Pathway Activation in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol.* 11:154.
- Sham C. W., Chan A. M., Kwong J. M. K., Caprioli J., Nusinowitz S., Chen B., Lee J. G., Gandhi N. M., Francisco L. M., Sharpe A. H., Chen L., Braun J., Gordon L. K. (2012) Neuronal Programmed Cell Death-1 Ligand Expression Regulates Retinal Ganglion Cell Number in Neonatal and Adult Mice. *J Neuroophthalmol.* 32:227-237.
- Shamsuddin N., Kumar A. (2011) TLR2 mediates the innate response of retinal Muller glia to Staphylococcus aureus. *J Immunol.* 186:7089-7097.
- Shen W., Fruttiger M., Zhu L., Chung S. H., Barnett N. L., Kirk J. K., Lee S., Coorey N. J., Killingsworth M., Sherman L. S., Gillies M. C. (2012) Conditional Müllercell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J Neurosci.* 32:15715-15727.
- Shen W., Lee S. R., Mathai A. E., Zhang R., Du J., Yam M. X., Pye V., Barnett N. L., Rayner C. L., Zhu L., Hurley J. B., Seth P., Hirabayashi Y., Furuya S., Gillies M. C. (2021) Effect of selectively knocking down key metabolic genes in Müller glia on photoreceptor health. *Glia.* 69:1966-1986.
- Shibagaki N., Hanada K., Yamashita H., Shimada S., Hamada H. (1999) Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1 / ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur J Immunol.* 29:4081-4091.
- Singh P. K., Shiha M. J., Kumar A. (2014) Antibacterial responses of retinal Müller glia: production of antimicrobial peptides, oxidative burst and phagocytosis. *J Neuroinflammation.* 11:33.
- Sivakumar V., Foulds W. S., Luu C. D., Ling E. A., Kaur C. (2011) Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina. *J Pathol.* 224:245-260.
- Smith L. M., Kelleher N. L. (2013) Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods.* 10:186-187.
- So K. F., Aguayo A. J. (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res.* 328:349-354.
- Soday L., Potts M., Hunter L. M., Ravenhill B. J., Houghton J. W., Williamson J. C., Antrobus R., Wills M. R., Matheson N. J., Weekes M. P. (2021) Comparative Cell Surface Proteomic Analysis of the Primary Human T Cell and Monocyte Responses to Type I Interferon. *Front Immunol.* 12:600056.
- Sonoda K. H., Exley M., Snapper S., Balk S. P., Stein-Streilein J. (1999) CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med.* 190:1215-1226.

- Sonoda K. H., Faunce D. E., Taniguchi M., Exley M., Balk S., Stein-Streilein J. (2001) NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol.* 166:42-50.
- Sonoda K. H., Sakamoto T., Qiao H., Hisatomi T., Oshima T., Tsutsumi-Miyahara C., Exley M., Balk S. P., Taniguchi M., Ishibashi T. (2005) The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavity-associated immune deviation. *Immunology.* 116:390-399.
- Spiess B. M. (2010) Equine recurrent uveitis: the European viewpoint. *Equine Vet J Suppl.* 37:50-56.
- Steinberg R. H., Oakley B., 2nd, Niemyer G. (1980) Light-evoked changes in [K⁺]_o in retina of intact cat eye. *J Neurophysiol.* 44:897-921.
- Streilein J. W., Niederkorn J. Y., Shadduck J. A. (1980) Systemic immune unresponsiveness induced in adult mice by anterior chamber presentation of minor histocompatibility antigens. *J Exp Med.* 152:1121-1125.
- Streilein J. W., Niederkorn J. Y. (1981) Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med.* 153:1058-1067.
- Streilein J. W., Cousins S. W. (1990) Aqueous humor factors and their effect on the immune response in the anterior chamber. *Curr Eye Res.* 9 Suppl:175-182.
- Streilein J. W. (2003a) Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol.* 74:179-185.
- Streilein J. W. (2003b) Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol.* 3:879-889.
- Sugita S., Futagami Y., Smith S. B., Naggar H., Mochizuki M. (2006) Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. *Exp Eye Res.* 83:1459-1471.
- Sugita S., Usui Y., Horie S., Futagami Y., Aburatani H., Okazaki T., Honjo T., Takeuchi M., Mochizuki M. (2009a) T-cell suppression by programmed cell death 1 ligand 1 on retinal pigment epithelium during inflammatory conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:2862-2870.
- Sugita S., Usui Y., Horie S., Futagami Y., Yamada Y., Ma J., Kezuka T., Hamada H., Usui T., Mochizuki M., Yamagami S. (2009b) Human corneal endothelial cells expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) suppress PD-1⁺ T helper 1 cells by a contact-dependent mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:263-272.
- Sugita S., Kawazoe Y., Imai A., Usui Y., Takahashi M., Mochizuki M. (2013) Suppression of IL-22-producing T helper 22 cells by RPE cells via PD-L1/PD-1 interactions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:6926-6933.

- Sun B., Rizzo L. V., Sun S. H., Chan C. C., Wiggert B., Wilder R. L., Caspi R. R. (1997) Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper-1-like or a T helper-2-like response. *J Immunol.* 159:1004-1011.
- Sun J., Qian P., Kang Y., Dai H. B., Wang F. Z., Wang H. Y., Zhou H., Gao Q., Zhou Y. B. (2021) Adrenomedullin 2 attenuates LPS-induced inflammation in microglia cells by receptor-mediated cAMP-PKA pathway. *Neuropeptides.* 85:102109.
- Sundararaj K., Rodgers J., Angel P., Wolf B., Nowling T. K. (2021) The role of neuraminidase in TLR4-MAPK signalling and the release of cytokines by lupus serum-stimulated mesangial cells. *Immunology.* 162:418-433.
- Szober C. M., Hauck S. M., Euler K. N., Fröhlich K. J. H., Alge-Priglinger C., Ueffing M., Deeg C. A. (2012) Profound Re-Organization of Cell Surface Proteome in Equine Retinal Pigment Epithelial Cells in Response to In Vitro Culturing. *Int J Mol Sci.* 13:14053-14072.
- Tajiri N., Kato T., Satoh M., Iizuka M., Taniguchi M., Kitaichi N., Iwabuchi K. (2021) The protective function of invariant natural killer T cells in the relapse of experimental autoimmune uveoretinitis. *Exp Eye Res.* 203:108406.
- Takeuchi M., Alard P., Streilein J. W. (1998) TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol.* 160:1589-1597.
- Taylor A. W., Streilein J. W., Cousins S. W. (1992) Identification of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential immunosuppressive factor in aqueous humor. *Curr Eye Res.* 11:1199-1206.
- Taylor A. W., Streilein J. W., Cousins S. W. (1994) Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor. *J Immunol.* 153:1080-1086.
- Taylor A. W., Ng T. F. (2018) Negative regulators that mediate ocular immune privilege. *J Leukoc Biol.* 103:1179-1187.
- Taylor S., Srinivasan B., Wordinger R. J., Roque R. S. (2003) Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 111:189-197.
- Tesena P., Kingkaw A., Vongsangnak W., Pitikarn S., Phaonakrop N., Roytrakul S., Kovitvadi A. (2021) Preliminary Study: Proteomic Profiling Uncovers Potential Proteins for Biomonitoring Equine Melanocytic Neoplasm. *Animals (Basel).* 11:1913.
- Thurau S. R., Mempel T. R., Flügel A., Diedrichs-Möhring M., Krombach F., Kawakami N., Wildner G. (2004) The fate of autoreactive, GFP+ T cells in rat models of uveitis analyzed by intravital fluorescence microscopy and FACS. *Int Immunol.* 16:1573-1582.

- Toft-Kehler A. K., Skytt D. M., Svare A., Lefevre E., Van Hove I., Moons L., Waagepetersen H. S., Kolko M. (2017) Mitochondrial function in Müller cells - Does it matter? *Mitochondrion*. 36:43-51.
- Toft-Kehler A. K., Skytt D. M., Kolko M. (2018) A Perspective on the Müller Cell-Neuron Metabolic Partnership in the Inner Retina. *Molecular Neurobiology*. 55:5353-5361.
- Tomkins-Netzer O., Talat L., Bar A., Lula A., Taylor S. R., Joshi L., Lightman S. (2014) Long-term clinical outcome and causes of vision loss in patients with uveitis. *Ophthalmology*. 121:2387-2392.
- Tout S., Chan-Ling T., Holländer H., Stone J. (1993) The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*. 55:291-301.
- Tritten L., Gillis-Germitsch N., Kockmann T., Schnyder M. (2021) Quantitative proteomics analysis of Angiostrongylus vasorum-induced alterations in dog serum sheds light on the pathogenesis of canine angiostrongylosis. *Sci Rep*. 11:283.
- Tu Y., Zhu M., Wang Z., Wang K., Chen L., Liu W., Shi Q., Zhao Q., Sun Y., Wang X., Song E., Liu X. (2020) Melatonin inhibits Müller cell activation and pro-inflammatory cytokine production via upregulating the MEG3/miR-204/Sirt1 axis in experimental diabetic retinopathy. *J Cell Physiol*. 235:8724-8735.
- Uckermann O., Vargová L., Ulbricht E., Klaus C., Weick M., Rillich K., Wiedemann P., Reichenbach A., Syková E., Bringmann A. (2004) Glutamate-evoked alterations of glial and neuronal cell morphology in the guinea pig retina. *J Neurosci*. 24:10149-10158.
- Uhl P. B., Szober C. M., Amann B., Alge-Priglinger C., Ueffing M., Hauck S. M., Deeg C. A. (2014) In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis. *J Proteomics*. 109:50-62.
- Ulbricht E., Pannicke T., Hollborn M., Raap M., Goczałik I., Iandiev I., Härtig W., Uhlmann S., Wiedemann P., Reichenbach A., Bringmann A., Francke M. (2008) Proliferative gliosis causes mislocation and inactivation of inwardly rectifying K(+) (Kir) channels in rabbit retinal glial cells. *Exp Eye Res*. 86:305-313.
- Usui Y., Akiba H., Takeuchi M., Kezuka T., Takeuchi A., Hattori T., Okunuki Y., Yamazaki T., Yagita H., Usui M., Okumura K. (2006) The role of the ICOS/B7RP-1 T cell costimulatory pathway in murine experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol*. 36:3071-3081.
- Valença A., Mendes-Jorge L., Bonet A., Catita J., Ramos D., Jose-Cunilleras E., Garcia M., Carretero A., Nacher V., Navarro M., Ruberte J. (2021) TIM2 modulates retinal iron levels and is involved in blood-retinal barrier breakdown. *Exp Eye Res*. 202:108292.

- Valenzuela N. M. (2021) IFN γ , and to a Lesser Extent TNF α , Provokes a Sustained Endothelial Costimulatory Phenotype. *Front Immunol.* 12:648946.
- Van Gool S. W., Vandenberghe P., de Boer M., Ceuppens J. L. (1996) CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev.* 153:47-83.
- Van Severter G. A., Shimizu Y., Horgan K. J., Shaw S. (1990) The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol.* 144:4579-4586.
- Vanderlugt C. J., Miller S. D. (1996) Epitope spreading. *Curr Opin Immunol.* 8:831-836.
- Varki A. (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.* 2:25-40.
- Varki A. (2017) Are humans prone to autoimmunity? Implications from evolutionary changes in hominin sialic acid biology. *J Autoimmun.* 83:134-142.
- Vecino E., Rodriguez F. D., Ruzafa N., Pereiro X., Sharma S. C. (2016) Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 51:1-40.
- Virchow R. 1859. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: 20 Vorlesungen gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institute zu Berlin;* Hirschwald.
- von Toerne C., Menzler J., Ly A., Senninger N., Ueffing M., Hauck S. M. (2014) Identification of a Novel Neurotrophic Factor from Primary Retinal Müller Cells Using Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *Mol Cell Proteomics.* 13:2371-2381.
- Vono M., Lin A., Norrby-Teglund A., Koup R. A., Liang F., Loré K. (2017) Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4(+) T cells in vitro and ex vivo. *Blood.* 129:1991-2001.
- Wang D., Ozhegov E., Wang L., Zhou A., Nie H., Li Y., Sun X.-L. (2016) Sialylation and desialylation dynamics of monocytes upon differentiation and polarization to macrophages. *Glycoconj J.* 33:725-733.
- Wang J. J., Zhu M., Le Y. Z. (2015) Functions of Müller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World J Diabetes.* 6:726-733.
- Wang M., Ma W., Zhao L., Fariss R. N., Wong W. T. (2011) Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J Neuroinflammation.* 8:173.
- Wang M., Wang X., Zhao L., Ma W., Rodriguez I. R., Fariss R. N., Wong W. T. (2014) Macroglia-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina. *J Neurosci.* 34:3793-3806.

- Wang S., Boonman Z. F., Li H. C., He Y., Jager M. J., Toes R. E., Niederkorn J. Y. (2003) Role of TRAIL and IFN-gamma in CD4+ T cell-dependent tumor rejection in the anterior chamber of the eye. *J Immunol.* 171:2789-2796.
- Wang X., Yu Z., Zhao X., Han R., Huang D., Yang Y., Cheng G. (2021a) Comparative proteomic characterization of bovine milk containing β -casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. *J Sci Food Agric.* 101:718-725.
- Wang Y., Khan A., Antonopoulos A., Bouché L., Buckley C. D., Filer A., Raza K., Li K. P., Toluoso B., Gremese E., Kurowska-Stolarska M., Alivernini S., Dell A., Haslam S. M., Pineda M. A. (2021b) Loss of α 2-6 sialylation promotes the transformation of synovial fibroblasts into a pro-inflammatory phenotype in arthritis. *Nat Commun.* 12:2343.
- Weigand M., Degroote R. L., Amann B., Renner S., Wolf E., Hauck S. M., Deeg C. A. (2020) Proteome profile of neutrophils from a transgenic diabetic pig model shows distinct changes. *J Proteomics.* 224:103843.
- Weigand M., Hauck S. M., Deeg C. A., Degroote R. L. (2021) Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease. *J Proteomics.* 230:103989.
- Wenkel H., Chen P. W., Ksander B. R., Streilein J. W. (1999) Immune privilege is extended, then withdrawn, from allogeneic tumor cell grafts placed in the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:3202-3208.
- Wiedemann C., Amann B., Degroote R. L., Witte T., Deeg C. A. (2020) Aberrant Migratory Behavior of Immune Cells in Recurrent Autoimmune Uveitis in Horses. *Front Cell Dev Biol.* 8:101.
- Wikenheiser D. J., Stumhofer J. S. (2016) ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? *Frontiers in Immunology.* 7:00304.
- Wilbanks G. A., Streilein J. W. (1990) Characterization of suppressor cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced by soluble antigen. Evidence of two functionally and phenotypically distinct T-suppressor cell populations. *Immunology.* 71:383-389.
- Wilbanks G. A., Mammolenti M., Streilein J. W. (1991) Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). II. Eye-derived cells participate in generating blood-borne signals that induce ACAID. *J Immunol.* 146:3018-3024.
- Wilbanks G. A., Mammolenti M., Streilein J. W. (1992) Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). III. Induction of ACAID depends upon intraocular transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 22:165-173.
- Wilbanks G. A., Streilein J. W. (1992) Macrophages capable of inducing anterior chamber associated immune deviation demonstrate spleen-seeking migratory properties. *Reg Immunol.* 4:130-137.

- Wildner G., Diedrichs-Möhrling M. (2020) Molecular Mimicry and Uveitis. *Front Immunol.* 11:580636.
- Wilkins M. R., Pasquali C., Appel R. D., Ou K., Golaz O., Sanchez J. C., Yan J. X., Gooley A. A., Hughes G., Humphrey-Smith I., Williams K. L., Hochstrasser D. F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y).* 14:61-65.
- Winkler B. S., Arnold M. J., Brassell M. A., Puro D. G. (2000) Energy metabolism in human retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:3183-3190.
- Wu C. C., Yates J. R. (2003) The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol.* 21:262-267.
- Wurm A., Lipp S., Pannicke T., Linnertz R., Krügel U., Schulz A., Färber K., Zahn D., Grosse J., Wiedemann P., Chen J., Schöneberg T., Illes P., Reichenbach A., Bringmann A. (2010) Endogenous purinergic signaling is required for osmotic volume regulation of retinal glial cells. *J Neurochem.* 112:1261-1272.
- Xia P., Wu Y., Lian S., Yan L., Meng X., Duan Q., Zhu G. (2021) Research progress on Toll-like receptor signal transduction and its roles in antimicrobial immune responses. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1-15.
- Xiao J., Zhang H., Yang F., Xiao M., Zhou L., Yu R., Shao X., Ea V., Su L., Zhang X., Li X. (2021) Proteomic Analysis of Plasma sEVs Reveals That TNFAIP8 Is a New Biomarker of Cell Proliferation in Diabetic Retinopathy. *J Proteome Res.* 20:1770-1782.
- Xu H., Rizzo L. V., Silver P. B., Caspi R. R. (1997) Uveitogenicity is associated with a Th1-like lymphokine profile: cytokine-dependent modulation of early and committed effector T cells in experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunol.* 178:69-78.
- Xu H., Forrester J. V., Liversidge J., Crane I. J. (2003) Leukocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:226-234.
- Xu H., Dawson R., Forrester J. V., Liversidge J. (2007) Identification of novel dendritic cell populations in normal mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:1701-1710.
- Yafai Y., Eichler W., Iandiev I., Unterlauff J. D., Jochmann C., Wiedemann P., Bringmann A. (2014) Thrombospondin-1 is produced by retinal glial cells and inhibits the growth of vascular endothelial cells. *Ophthalmic Res.* 52:81-88.
- Yang W., Li H., Chen P. W., Alizadeh H., He Y., Hogan R. N., Niederkorn J. Y. (2009) PD-L1 Expression on Human Ocular Cells and Its Possible Role in Regulating Immune-Mediated Ocular Inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:273-280.

- Yoshinaga S. K., Whoriskey J. S., Khare S. D., Sarmiento U., Guo J., Horan T., Shih G., Zhang M., Coccia M. A., Kohno T., Tafuri-Bladt A., Brankow D., Campbell P., Chang D., Chiu L., Dai T., Duncan G., Elliott G. S., Hui A., McCabe S. M., Scully S., Shahinian A., Shaklee C. L., Van G., Mak T. W., Senaldi G. (1999) T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*. 402:827-832.
- Zeng Y., Ramya T. N., Dirksen A., Dawson P. E., Paulson J. C. (2009) High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. *Nat Methods*. 6:207-209.
- Zhang J., Wu G. S., Ishimoto S., Pararajasegaram G., Rao N. A. (1997) Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. Immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 38:1848-1857.
- Zhong Z., Su G., Kijlstra A., Yang P. (2021) Activation of the interleukin-23/interleukin-17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis. *Prog Retin Eye Res*. 80:100866.
- Zhou R., Horai R., Silver P. B., Mattapallil M. J., Zárata-Bladés C. R., Chong W. P., Chen J., Rigden R. C., Villasmil R., Caspi R. R. (2012) The living eye "disarms" uncommitted autoreactive T cells by converting them to Foxp3(+) regulatory cells following local antigen recognition. *J Immunol*. 188:1742-1750.
- Zhuang Z., Wang Y., Zhu G., Gu Y., Mao L., Hong M., Li Y., Zheng M. (2017) Imbalance of Th17/Treg cells in pathogenesis of patients with human leukocyte antigen B27 associated acute anterior uveitis. *Sci Rep*. 7:40414.
- Zipplies J. K., Kirschfink M., Amann B., Hauck S. M., Stangassinger M., Deeg C. A. (2010) Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology*. 215:949-955.
- Zwanzig A., Meng J., Müller H., Bürger S., Schmidt M., Pankonin M., Wiedemann P., Unterlauff J. D., Eichler W. (2021) Neuroprotective effects of glial mediators in interactions between retinal neurons and Müller cells. *Exp Eye Res*. 209:108689.

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg, ein ganz herzliches Dankeschön aussprechen für die Möglichkeit, an ihrem Lehrstuhl über ein so interessantes Thema zu promovieren und für die herausragende Betreuung dieser Doktorarbeit. Die Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit, mit der sämtliche meiner Anfragen beantwortet wurden, sind bemerkenswert. Vielen Dank für die kompetente Unterstützung, den rund-um-die-Uhr währenden Einsatz und die aufgebrachte Geduld, wenn die Müllers mal wieder nicht wachsen wollten.

Ein riesiges Dankeschön geht auch an meine so lieb gewonnenen aktuellen und ehemaligen Mitdoktoranden und -doktorandinnen Claudia Barfüßer, Dr. Isabella Giese, Dr. Bernhard Hobmaier, Anne Hoffmann, Lucia Korbonits, Dr. Sandra Sagmeister, Marie-Christin Schilloks, Dr. Franziska Stetter, Dr. Maria Weigand und Dr. Carmen Wiedemann. Euch als Kollegen zu haben ist wirklich ein Segen und hat mein Doktoranden-Dasein unglaublich bereichert. Danke für die unglaublich lustige Zeit und dass ich immer auf eure Unterstützung zählen konnte! Mit euch machen sogar nächtliche FACS-Sessions Spaß... Danke besonders dir, liebe Claudi, dass ich jederzeit in dein Büro stürmen oder dir Figures schicken durfte und du immer zur Stelle warst und jeden noch so kleinen Fehler gefunden hast!

Vielen lieben Dank an unsere Postdocs Dr. Roxane Degroote, Dr. Kristina Kleinwort, Dr. Adrian Schmalen und Dr. Margarete Swadzba für eure tatkräftige Unterstützung. Dankeschön vor allem an Roxy und Krissi, dass ihr euch auch dann Zeit genommen habt, wenn ihr viel um die Ohren hattet und für eure wirklich geduldige Hilfe!

Ein großes Dankeschön geht an unsere TAs Barbara Amann, Florian Gosselin, Claudia Guggenmoos, Sieglinde Hirmer, Lydia Hoffmann und Stefanie Püls für eure Unterstützung im Labor und vor allem für das Müllerzellen-Sitting. Ein besonderer Dank gebührt an dieser Stelle dir, liebe Laborfee Sieglinde. Danke, dass du wirklich jederzeit ein offenes Ohr und einen guten Ratschlag hattest, für deine engelsgleiche Geduld und deine unermüdliche Hilfe beim Augen-Schnippeln und sonstigen Labortätigkeiten. Bärbl, vielen lieben Dank für die tatkräftige und wortgewaltige Unterstützung am Mikroskop und bei der Auswertung.

Ganz herzlich möchte ich mich bedanken bei Nicole Veit und ihrem Team sowie bei Adrian Sandbiller für die Überlassung von Probenmaterial. Danke für euren Einsatz und eure Spontaneität, ohne die ich oft aufgeschmissen gewesen wäre.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben. Danke, dass ihr geduldig zugehört habt, wenn ich am Esstisch unbedingt loswerden musste, wie man Augen aufschneidet und zerschnippelt, um daraus Müllerzellen zu präparieren oder wenn ich euch die Grundlagen der Durchflusszytometrie erklären wollte. Danke an meinen Bruder Johannes für das schnelle, akribische und (zumindest für mich) durchaus erheiternde Korrekturlesen, und an meine Schwester Mirijam, dass du dich um mein Pferdchen gekümmert hast, wenn ich mal wieder mit den Müllerzellen beschäftigt war.

Mein größtes Dankeschön gilt meinem lieben Mann Lukas. Ohne dich hätten mir so manche Einzelheiten meines Doktorandenalltags den letzten Nerv geraubt. Danke, dass du dir sämtliche Geschichten aus dem Laboralltag angehört hast, danke für deine aufmunternden Ratschläge, und vor allem danke, dass du nicht müde geworden bist, mich darauf aufmerksam zu machen, dass es ein Leben außerhalb des Labors bzw. Büros gibt. Ich bin sehr froh, dass du so geduldig und fröhlich alle Höhen und Tiefen meines Doktorandendaseins mit mir durchgetragen hast.