

Aus dem
CharitéCentrum für Audiologie/Phoniatrie, Augen- und HNO-Heilkunde
Klinik für Augenheilkunde
Direktor/in: Prof. Dr. Antonia Jousen

Habilitationsschrift

Immunprivileg des Auges: Ca²⁺-Signaling der äußeren Blut-Retina-Schranke

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Ophthalmologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Von

Dr. med. Nadine Reichhart
geboren in München

Eingereicht: Oktober 2022

Dekan: Prof Dr. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Mike O. Karl, Dresden
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Marius Ueffing, Tübingen

1 Inhalt

0. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG: Anatomische und funktionelle Grundlagen des Immunprivilegs der Retina.....	6
1.1 Die anatomische Struktur der Retina	6
1.2 Immunprivileg der Retina.....	8
1.2.1 Äußere Blut-Retina-Schranke.....	9
1.2.2 Funktionen des Retinalen Pigmentepithels (RPE)	10
1.2.3 Beitrag zum Immunprivileg des Auges als Teil der Äußeren Blut-Retina Schranke	13
1.2.4 Ionale Mechanismen des Immunprivilegs.....	15
1.3 Zusammenfassung und Hypothese	17
2 ORIGINALARBEITEN	18
2.1 Anoctamin2 (TMEM16B) forms the Ca ²⁺ -activated Cl ⁻ channel in the retinal pigment epithelium.	18
2.2 Anoctamin-4 is a bona fide Ca ²⁺ -dependent non-selective cation channel	33
2.3 Prediction of functional consequences of missense mutations in ANO4 Gene.....	46
2.4 Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium	60
2.5 Rab27a GTPase modulates L-type Ca _v 1.3 channel function via interaction with the II-III linker of Ca _v 1.3 subunit	73
2.6 Inhibition of Placenta Growth Factor Reduces Subretinal Mononuclear Phagocyte Accumulation in Choroidal Neovascularization.	85
3 DISKUSSION	98
3.1 Das RPE als aktive Barriere: ionale Mechanismen der Sekretionssteuerung.....	98
3.1.1 Die Anoctamine	99
3.1.1.1 Anoctamin 2 (Ano2).....	100
3.1.1.2 Anoctamin 4 (Ano4).....	101
3.1.1.3 Ano2 und Ano4 im Ca ²⁺ -Signaling.....	102
3.1.2 Die Oberflächenexpression von Ca _v 1.3 und TRPV2	104
3.1.3 Funktionelle Bedeutung der Anoctamine und Ca ²⁺ -Kanäle über die VEGF-A Sekretion hinaus	106
3.1.3.1 Transepithelialer Transport von Wasser und Cl ⁻	106
3.1.3.2 Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente.....	110

3.2	VEGF-A und das VEGF-Rezeptornetzwerk: Inflammation und Angiogenese	112
3.2.1	VEGF-A und PGF in der Koordination von Inflammation und Angiogenese im Tiermodell für chorioidale Neovaskularisation	113
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	116
5	REFERENZEN.....	118
6	DANKSAGUNG	141
7	ERKLÄRUNG.....	142

0. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
Ano	Anoctamin
BK	Maxi-K Ca ²⁺ -abhängiger K ⁺ -Kanal
BVMD	Best's vitelliforme Makuladystrophie
CaCC	Ca ²⁺ -abhängiger Chlorid-Kanal
CBD	Cannabidiol
DHA	Docosahexaensäure
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm
GCL	retinale Ganglienzellschicht (english: G anglion C ell L ayer)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
INL	innere nukleäre Schicht (english: I nnere N uclear L ayer)
IPL	innere plexiforme Schicht (english: I nnere P lexiforme L ayer)
IPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen
KO	knock-out
LP	Light Peak
MP	mononukleäre Phagozyten
PEDF	Pigment epithelium derived factor
PGF	Plazentawachstumsfaktor (english: P lacental G rowth F actor)
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
POS	Photorezeptoraußensegmente (english: P hotoreceptor O uter S egments)
RPE	Retinales Pigmentepithel
TGFβ	Transforming growth factor β
TRPV2	T ransient R eceptor P otential cation channel subfamily V member 2
VDCC	Spannungsabhängige Ca ²⁺ Kanäle (english: V oltage D eendent C alcium C hannels)
VEGF	V ascular E ndothelial G rowth F actor

VEGFR1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
WT	Wildtyp
ZO-1	Zonula occludens 1

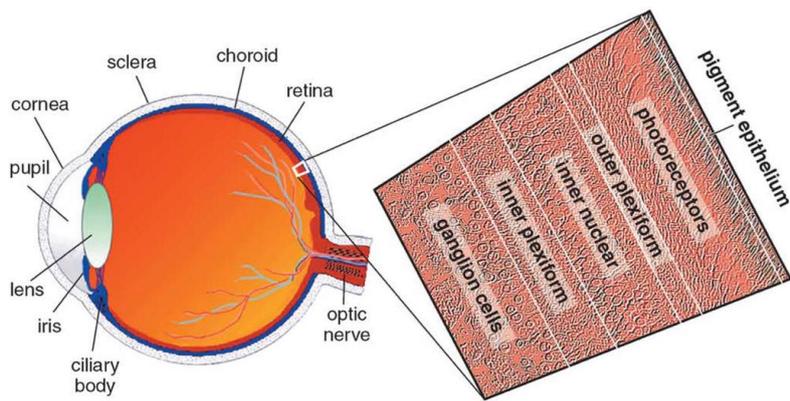
1. EINLEITUNG: Anatomische und funktionelle Grundlagen des Immunprivilegs der Retina

1.1 Die anatomische Struktur der Retina

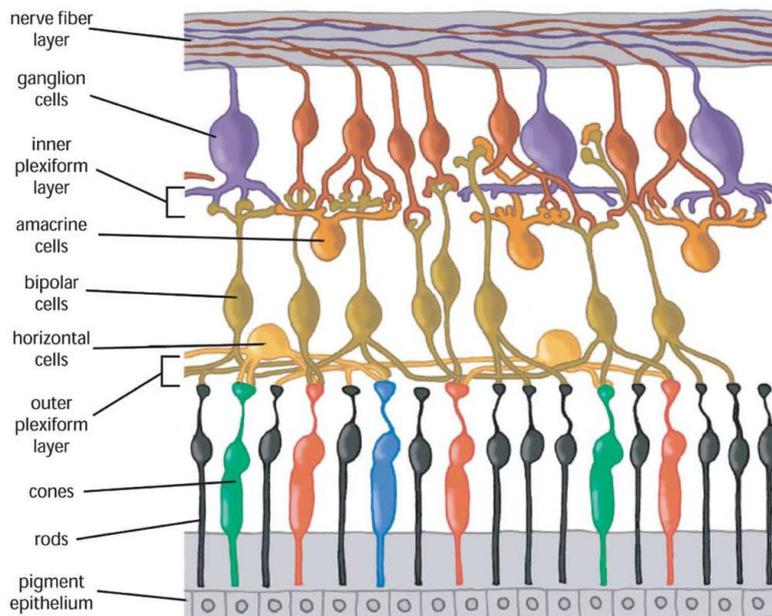
Der Sehsinn ist der wichtigste Sinn des Menschen. Hierfür ist die Netzhaut, oder auch Retina, von zentraler Wichtigkeit. Aufgabe der Retina ist es, das durch die Hornhaut einfallende und durch die Linse gebündelte Licht mittels der Photorezeptoren in Nervenimpulse umzuwandeln, diese zu modulieren und über die Ganglienzellen nach zentral weiterzuleiten. Damit das ungehindert gelingt, ist die Integrität und das Zusammenspiel der 10 verschiedenen retinalen Zellschichten notwendig.

Die Retina der Wirbeltiere ist invertiert aufgebaut, d.h. die lichtempfindlichen Zellen, die Photorezeptoren, befinden sich auf der äußeren, dem Licht abgewandten Seite. Von außen nach innen gliedert sich der Aufbau der Retina wie folgt (siehe schematische Darstellung Abb.1, Seite (Abràmoff et al., 2010)): Beginnend mit dem Retinalen Pigmentepithel (RPE), welches nach außen von der gefäßreichen Aderhaut, der Chorioidea, durch die Bruch'sche Membran begrenzt wird, folgen die Außensegmente der Photorezeptoren (POS), welche von der apikalen Membran des RPE eng umschlungen werden, sowie die inneren Segmente der Photorezeptoren. In den Photorezeptoren kommt es zur Phototransduktion, d.h. zur Umwandlung der elektromagnetischen Energie in Veränderungen des Membranpotentials, welche dann über eine Verminderung der Glutamatfreisetzung an die Bipolarzellen weitergeleitet wird. Durch die äußere Grenzschicht (outer limiting membrane) von den Photorezeptoren getrennt, folgt die äußere Körnerschicht (ONL). Diese umfasst die Zellkörper der Photorezeptoren. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) sind die Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen, sowie der Horizontalzellen lokalisiert. Deren Somata befinden sich in der angrenzenden inneren nukleären Schicht (INL). Dort befinden sich auch die Zellkörper der Müllerzellen, die mit ihren Ausläufern die Retina von der Ganglienzellschicht bis zu den Photorezeptor-Innensegmenten durchziehen und dabei sowohl stabilisierende als auch funktionelle Aufgaben (v.a. in Bezug auf Ionen -und Wasserhomöostase und die Erhaltung der Erregbarkeit der Photorezeptoren übernehmen (Reichenbach & Bringmann, 2013). Die INL beherbergt zusätzlich noch die Gruppe der heterogenen Amakrinzellen, welche über synaptische

Verbindungen zu den Bipolarzellen indirekt sowie zu den Ganglienzellen direkt die Erregung der Ganglienzellen modulieren. Die Schicht der synaptischen Verbindungen zwischen Bipolarzellen, Ganglienzellen sowie Amakrinzellen wird innere plexiforme Schicht (IPL) genannt. Die Ganglienzellschicht (GCL) beherbergt die Ganglienzellen, deren lange Axone den Sehnerv bilden. Diese werden von Astrozyten umschlungen (Hoon et al., 2014). Ein weiterer ubiquitär in der Netzhaut lokalisierter Zelltyp, sind Mikrogliazellen, die Surveillanceaufgaben erfüllen und in der Pathophysiologie zahlreicher retinaler Erkrankungen aktiv werden (Karlstetter et al., 2015). In Richtung Glaskörper wird die Retina durch die innere Grenzmembran, die aus den basalen Endfüßen der Müllerzellen gebildet wird, abgegrenzt.



(a)



(b)

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Auges (a) sowie der einzelnen Schichten der Retina (b) aus (Abràmoff et al., 2010) outer plexiform layer (OPL), outer nuclear layer (ONL), inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL), ganglion cells (GCL).

1.2 Immunprivileg der Retina

Das Immunprivileg der Retina bzw. der äußeren Blut-Retina-Schranke besteht in der Entkoppelung die neuronalen/glialen Strukturen der Netzhaut vom systemischen Immunsystem. Dies beinhaltet

die mechanische Begrenzung gegenüber der Diffusion immunmodulatorischer Botenstoffe und der Migration von Zellen des Immunsystems. Zudem besteht eine aktive Abwehr systemischer Immunreaktionen durch lokale anatomische Gegebenheiten, Sekretion immunsuppressiver und anti-inflammatorischer Zytokine und Expression von Zelloberflächenproteinen. Das RPE bildet mit seinen Tight-Junctions die äußere Blut-Retina-Schranke. Es handelt sich hierbei aber nicht bloß um eine mechanische Barriere, welche systemische Einflüsse in Form migrierender Immunzellen zurückhält, sondern das RPE vermittelt das Immunprivileg vor allem auch durch die Sekretion von immunsuppressiven Faktoren (Streilein, 1999, 2003), da die Immunzellen zunächst durch die Bruch'sche Membran vom RPE getrennt sind und keine Kontaktinhibition stattfinden kann.

1.2.1 Äußere Blut-Retina-Schranke als Barriere

Das Retinale Pigmentepithel (RPE) ist ein polares einschichtiges Epithel bestehend aus kuboiden, pigmentierten Zellen, welche mittels Tight-Junctions (zonulae occludentes) und Adhäsionsmolekülen (zonulae adherentes) miteinander verbunden sind. Durch seine exponierte Lage zwischen den POS und der Retina auf der apikalen Seite, welche es mit Mikrovilli umschließt, und der stark perfundierten Chorioidea auf der basalen Seite, von der es nur durch eine Schicht extrazellulärer Matrix, die Bruch'sche Membran, getrennt wird, stellt das RPE eine wichtige Grenzfläche zwischen der Retina und dem Körperkreislauf dar.

Die molekulare Zusammensetzung der Tight-Junctions macht das RPE zu einem funktionell dichten Epithel: der parazelluläre Widerstand ist mehr als 10 mal höher als der transzelluläre Widerstand (Miller & Steinberg, 1977; Oakley, 1977). Die Tight-Junctions stellen damit das Korrelat der äußeren Blut-Retinaschranke dar (Kaur et al., 2008).

Die Tight-Junctions bedingen neben ihrer Funktion einer transepithelialen Barriere gleichzeitig die Polarität der Zellen, eine funktionell apikal/basolaterale Kompartimentierung über die Ausbildung einer intramembranalen Barriere. Das ist Grundlage für einen gerichteten transepithelialen Transport zwischen Retina und Chorioidea sowie - mittels der apikal/basolateral polar

differentiellen Sekretion verschiedener Proteine - für die Kommunikation mit den benachbarten Strukturen (A. D. Marmorstein, 2001).

1.2.2 Funktionen des Retinalen Pigmentepithels (RPE)

Als aktive Barriere und Interaktionspartner der Photorezeptoren erfüllt das RPE viele wichtige Funktionen für die retinale Homöostase und Integrität, die essentiell für die Erhaltung des Visus als auch direkt an der visuellen Funktion beteiligt sind (Strauss, 2005).

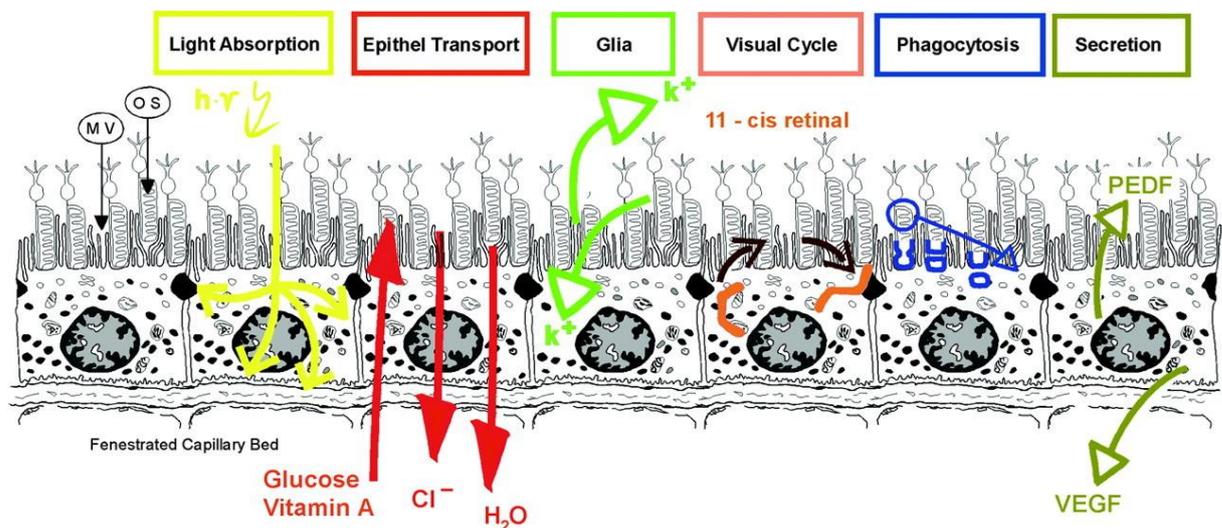


Abbildung 2: Überblick über die Physiologischen Funktionen des RPE. MV: microvilli; OS: outer segments of photoreceptors; VEGF: vascular epithelial growth factor; PEDF: pigment epithelium derived growth factor (Strauss, 2005)

Angelehnt an Strauss (Strauss, 2005) sind folgende Funktionen hervorzuheben:

1. Transepithelialer Transport von Nährstoffen, Ionen und Wasser.

Das RPE transportiert wichtige Metabolite aus dem Körperkreislauf zu den Photorezeptoren, darunter Glukose, Retinal, das Chromophor der Sehpigmente, und Docosahexaensäure (DHA). Die Anwesenheit von DHA als wichtigster Baustein der Plasmamembran der Photorezeptoren ist

nötig für die Erneuerung der Außensegmente und den Transport von Retinal. Darüber hinaus wird auch eine anti-inflammatorische und anti-apoptotische Rolle v.a. in Bezug auf retinale Ganglienzellen diskutiert (Querques et al., 2011). Im Gegenzug dazu werden metabolische Endprodukte und überschüssiges Wasser, welches vordergründig durch den Stoffwechsel der Photorezeptoren entsteht und durch den intraokulären Druck aus dem vorderen Augenbereich in Richtung Netzhaut getrieben wird, in Richtung Chorioidea abtransportiert. Der Wassertransport wird durch den aktiven transepithelialen Transport von Cl^- Richtung Chorioidea angetrieben (Hu et al., 1996; Miller & Edelman, 1990).

2. Lichtabsorption und Protektion der Retina vor oxidativem Stress

In der äußeren Netzhaut ist die Sauerstoffkonzentration sehr hoch. Dies entsteht durch die starke Perfusion der Chorioidea bei geringer O_2 -Extraktion durch das Gewebe (Alm & Bill, 1970, 1973). Dem gegenüber steht die hohe Lichtenergie, gebündelt durch die Linse, und ein Umfeld, welches reich an chemischen Verbindungen ist, die durch hohe Dichte an Kohlenstoff Doppel- sowie Dreifachbindungen extrem vulnerabel für den O_2 Einbau durch photochemische Beschleunigung sind. Zudem erhöht die Phagozytose von POS noch zusätzlich die Konzentration freier Radikale. Das RPE hat daher verschiedene Strategien entwickelt, mit oxidativem Stress umzugehen: zum einen die Lichtabsorption durch das Vorhandensein von Pigmenten, vor allem Melanin (Beatty et al., 1999) zum anderen enzymatische und nichtenzymatische Antioxidantien sowie enzymatischen Reparaturmechanismen. Im Rahmen des normalen Alterungsprozesses, als auch beschleunigt bei verschiedenen Retina-Degenerationen, wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) oder dem Morbus Best, kommt es zu einer Ansammlung von Lipofuszin, einem Komposit verschiedener Endprodukte u.a. des Retinastoffwechsels, der Autophagie und der Phagozytose (Boulton & Dayhaw-Barker, 2001; Delori et al., 2001; Parish et al., 1998).

3. Re-Isomerisierung von all-trans-retinal zu 11-cis-retinal

Sehen wird durch die Absorption eines Photons durch 11-cis-Retinal, dem Chromophor des Rhodopsins ermöglicht (Cooper, 1979). Daraus entsteht eine Konformationsänderung zum all-trans-Retinal, welche über eine gleichzeitige sterische Änderung der Tertiärstruktur des Rhodopsins, die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Signalweges zur Phototransduktion und

Weiterleitung des Signals bewirkt. Die Re-Isomerisierung von all-trans-Retinal zu 11-cis-Retinal (auch Sehzyklus) findet im RPE statt (Lamb & Pugh, 2004; Thompson & Gal, 2003). Diese enzymatische Reaktion sowie der anschließende Transport des 11-cis-Retinal zu den Photorezeptoren ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Lichtabsorption (Thompson & Gal, 2003).

4. Kontrolle der Ionenzusammensetzung des subretinalen Raums

Dies betrifft vordergründig die K^+ -Konzentration und das extrazelluläre Volumen (Steinberg et al., 1983). Zur Erhaltung ihrer Erregbarkeit benötigen die Photorezeptoren eine konstante extrazelluläre K^+ -Konzentration, da diese das Ruhemembranpotential definiert, dessen Änderung die Anwesenheit von Licht kodiert. Sinkt das extrazelluläre K^+ nach Erhöhung der Lichtintensität, werden durch die Hyperpolarisation der apikalen Membran des RPE zum Ausgleich dort befindliche einwärts rektifizierende K^+ -Kanäle aktiviert, die wiederum durch den Ausstrom von K^+ aus dem RPE in den subretinalen Raum die K^+ Absenkung ausgleichen. Lichtinduzierte Änderungen im Extrazellulärvolumen werden durch die Anpassung des Cl^- -Transportes durch „Second-Messenger“ abhängige Aktivierung von Cl^- -Kanälen in der basolateralen Membran und damit des Wassertransportes bewerkstelligt.

5. Phagozytose von POS

Photorezeptoren sind physikalisch maximal empfindlich, daher bedingt die Photoabsorption gleichzeitig die kontinuierliche Zerstörung der lichtempfindlichen Außensegmente. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind Photo-Oxidation, welche langsam vor sich geht, oder akut der hochenergetische Impact des konzentrierten Lichts. Die zerstörten Spitzen werden abgestoßen und vom RPE phagozytiert, neue Außensegmente von der Basis zur Erneuerung ausgebildet. Die Phagozytose, die einem festen täglichen Rhythmus folgt, basiert auf einem dreiteiligen Prozess: dem Erkennen der Außensegmente durch RPE Zellen, deren Einschluss und schließlich die Degradation (Mazzoni et al., 2014). Für die Kontrolle des zirkadianen Rhythmus ist die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} , vermittelt über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle essentiell (Müller et al., 2014).

6. Sekretion von verschiedenen Wachstumsfaktoren

Das RPE ist ein sekretorisches Epithel. Unter physiologischen Bedingungen werden Faktoren zur Stabilisierung der Photorezeptoren apikal sezerniert (z.B. Pigment epithelium derived factor (PEDF), welcher neurotroph auf die Retina wirkt), Fibroblast growth factor (FGF), Transforming growth factor (TGF- β) und insulin-like growth factor (IGF-1). Durch die basolaterale Membran in Richtung Chorioidea sezerniert das RPE, wie in den folgenden Kapiteln noch vertieft wird, vor allem vascular endothelial growth factor (VEGF-) A. VEGF-A wirkt zusammen mit Proteinen der tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) - Familie (ebenfalls aus dem RPE) stabilisierend auf Struktur hier vor allem auf die Fenestrierung der chorioidalen Kapillaren (Blaauwgeers et al., 1999). Die Balance der Aktivität von Matrixmetalloproteasen und ihren Inhibitoren (TIMP) ist wichtig für den Erhalt der Extrazellulärmatrix, welche aus Kollagenen, Fibronectin, Laminin etc. besteht. Veränderungen der Expression dieser Enzyme bzw. deren Inhibitoren führt zu verschiedenen Pathologien, so auch der chorioidalen Neovaskularisation (CNV) bei der AMD. Hierbei kommt es enzymatisch bedingt unter anderem zur Aufhebung der Blockade endothelialer VEGF-Rezeptoren, Schäden der Bruchmembran sowie der RPE-Interphotorezeptormatrix und so zu Ablösung des RPEs und zur Invasion der chorioidalen Endothelzellen (Plantner et al., 1998; Steen et al., 1998; Webster et al., 1999). Im Kontext proliferativer retinaler Erkrankungen führt die gesteigerte VEGF-A Sekretion unter verminderter TIMP Sekretion zur Induktion von pathologischer Neovaskularisation (zum Beispiel im Zusammenhang mit der feuchten Form der AMD). Des Weiteren werden auch immunmodulierende Faktoren sezerniert, das humorale Korrelat des Immunprivilegs (siehe nächster Abschnitt).

1.2.3 Beitrag zum Immunprivileg des Auges als Teil der Äußeren Blut-Retina Schranke

Barrieren schaffen eine Trennung von immunprivilegierten Geweben und dem Körperkreislauf. Das RPE als Schranke zwischen der Retina und dem Körperkreislauf lässt sich als sogenannte „educational barrier“ einordnen. Diese grenzt sich von der „true barrier“ ab, die durch Tight-Junctions eine mechanische Barriere und durch Oberflächenproteine der Endothelien eine

inhibitorische Barriere bildet (Shechter et al., 2013). Damit hält die „true barrier“ das Immunsystem außerhalb des immunprivilegierten Raums. Die „educational barriers“ bestehen aus fenestriertem Endothel und einem Epithel. Das Epithel bietet hier durch Tight-Junctions auf der einen Seite eine mechanische Barriere, vermittelt aber auf der anderen Seite durch homöostatisches „Gaten“ von Immunzellen eine Interaktion mit diesen Zellen. Diese Interaktion ermöglicht es dem Epithel die lokale Immunantwort nicht nur einfach zu blocken, sondern zu orchestrieren, wodurch regenerative oder pro-angiogene Effekte erzielt werden können, weil die Art der Immunzellen erkannt werden kann (Shechter et al., 2013). Somit unterscheiden sich die beiden Entitäten von Barrieren klar durch die Zellen, die die Verbindungen bilden (Endothel vs. Epithel), die anatomische Lage (Parenchym vs. Peripherie) und die Immunmodulierende Wirkung, die den „educational barriers“ eigen ist. Als grundlegende Mechanismen der Immunmodulation an der „educational barrier“ postulieren Shechter et al: Determinierung des Phänotyps permeierender Zellen durch selektive Rekrutierung, selektives Überleben, Metabolitbereitstellung sowie Aktivierung bestimmter Zellen. Des Weiteren werden unpassende Zellen unterdrückt und bestimmte Liniendifferenzierung bzw. die Ausbildung bestimmter funktioneller Merkmale (Shechter et al., 2013) induziert.

In der Retina existieren zwei Barrieren, die innere und äußere Blut-Retina-Schranke. Die innere Blut-Retina-Schranke bildet eine „true barrier“, bestehend aus dem dichten Endothel der Gefäße der inneren Netzhaut, verbunden durch Tight-Junctions und bedeckt von Müllerzellendfüßen und Astrozyten. Diese Barriere bricht bei entzündlichen Erkrankungen der Netzhaut zusammen. Veränderungen der Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle, Entzündungszellen, darunter vor allem Typ-1-T-Helferzellen (TH1), TH17 und Zytokine wie TNF α , IL1 β , sowie reaktive Oxygen Spezies (ROS) sind hieran beteiligt (Kerr et al., 2008; Luger et al., 2008; Luna et al., 1997).

Die äußere Blut-Retina-Schranke ist eine „educational barrier“, bestehend aus dem durch Tight-Junctions verbundenen Zellen des dichten RPE und den fenestrierten Kapillaren der Choriokapillaris. Sie ist umgeben von immunmodulierenden Faktoren wie TGF β , IL10, Somatostatin, sowie Thrombospondin-1 und den an der Apoptose beteiligten Faktoren FAS Antigen Ligand (FAS-L), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) und programmed cell death

1 ligand (PDL1) (Kaur et al., 2008; Kerr et al., 2008; Sugita, 2009; Sugita et al., 2006). Zusätzlich exprimieren RPE Zellen immunsuppressive Proteine, welche die entzündliche Aktivität von T-Zellen hemmen oder die Differenzierung von Immunzellen beeinflussen (Ishida et al., 2003; Sugita, 2009; Sugita et al., 2006). Durch seine Sekretion von VEGF-A beteiligt sich das RPE am VEGF-Signalsystem, das angiogene Aktivität und mit ihr verbundenen Entzündungsreaktionen durch die verschiedenen VEGF-Rezeptoren koordiniert (Autiero et al., 2003; Carmeliet et al., 2001; Claesson-Welsh, 2016).

1.2.4 Ionale Mechanismen des Immunprivilegs

Im Wesentlichen erfolgt die Orchestrierung der lokalen Immunreaktionen im Sinne der „educational barrier“ durch das RPE über die sekretorische Aktivität, da das RPE vom Endothel der Choriokapillaris durch die Bruch'sche Membran getrennt ist. Durch die Funktion als sekretorisches Epithel ist das RPE mit den Proteinen ausgestattet, die für endokrine Zellen erforderlich sind. Das sind neben den Carrierproteinen für sekretorische Vesikel (z.B. Rab27a) auch eine Reihe von Ionenkanälen, da der Trigger zur Freisetzung der Vesikel eine Erhöhung des freien zytosolischen Ca^{2+} ist. Im Zentrum steht zum einen der potentialabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanal des neuroendokrinen Subtyps ($\alpha 1D$ oder $\text{Cav}1.3$) der zuerst in den β -Inselzellen des Pankreas beschrieben wurde und dort einen Hauptregulator der Insulinsekretion darstellt (Yang et al., 2012). Dieser Kanal reguliert die z.B. die Sekretion des VEGF-A durch das RPE, die im Falle der neovaskulären AMD durch Faktoren wie bFGF und erhöhte Tyrosinphosphorylierung heraufgeregt ist (Rosenthal et al., 2005, 2007; Strauss et al., 1999, 2000). Die Stärke der Sekretion wird durch die Amplitude und zeitlichen Verlauf des Ca^{2+} -Signals gesteuert (Berridge et al., 2000). Das heißt für den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, dass die Sekretionsaktivität höher ist, wenn die Kanalaktivität höher ist. Dies konnte für die Stimulation der RPE Zellen durch bFGF und durch Analyse von RPE Zellen aus neovaskulären Membranen gezeigt werden (Rosenthal et al., 2007). Im Sinne der Modulation des Ca^{2+} -Signals als Trigger für die Sekretion, kann auch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivität begrenzt werden. Dafür exprimiert die RPE Zelle Ionenkanäle, die die direkten Antagonisten für den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal darstellen. Der potentialabhängige K^+ -Kanal $\text{K}_v1.3$ hat eine dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal analoge Potentialabhängigkeit und kehrt die für die L-Typ- Ca^{2+} -

Kanalaktivierung notwendige Depolarisation in eine Hyperpolarisation der Zelle um. Da $K_v1.3$ sehr viel langsamer als der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal aktiviert, begrenzt $K_v1.3$ die L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivität zeitlich. Parallel wird der Maxi-K Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanal (BK) aktiviert, der die Menge des einströmenden Ca^{2+} begrenzt, weil er ab einer bestimmten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert und den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal durch Hyperpolarisation deaktiviert (Hughes et al., 1995; Pinto & Klumpp, 1998; Strauss et al., 2002; Wimmers et al., 2007, 2008). Neben dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal wurde bisher der potentialunabhängige TRPV2 Kanal (**t**ransient **r**eceptor **p**otential **v**anilloid-subtype **2**) als Regulator der VEGF-A Sekretion identifiziert. Er setzt zum Beispiel die Stimulation der Zelle durch IGF-1 in VEGF-A Sekretion um. Da IGF-1 und sein Rezeptor auf RPE Zellen in neovaskulären Membranen von AMD Patienten (Lambooj et al., 2003) sowie die IGF-1-stimulierte VEGF-A Sekretion durch diese RPE Zellen nachgewiesen wurde (Cordeiro et al., 2010), spielt TRPV2-abhängige Regulation der VEGF-A Sekretion vermutlich eine Rolle in der chorioidalen Neovaskularisation bei AMD. Auch intrazelluläre Ca^{2+} -Anstiege werden durch diesen Kanal moduliert, was jedoch nicht durch die Potentialabhängigkeit des Kanals selbst erfolgt, sondern durch Justierung der elektrischen treibenden Kräfte für den Ca^{2+} -Einstrom durch die TRPV2 Pore. Die durch den Ca^{2+} -Einstrom aktivierten BK- und Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle würden die Zelle hyperpolarisieren und den Ca^{2+} -Einstrom verstärken. Die Aktivierung eines bisher nicht näher identifizierten Ca^{2+} -abhängigen nicht-selektiven Kationenkanals würde die Zelle depolarisieren, die treibenden Kräfte verkleinern und den Ca^{2+} -Einstrom vermindern.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Steuerung der Sekretion über eine Agonisten-spezifische Aktivierung von Ca^{2+} -leitenden Ionenkanälen und deren Kontrolle gesteuert wird. Die Aktivierungsmechanismen sind bisher nicht genau bekannt und können durch Modulation von Potentialabhängigkeit, Oberflächenexpression des Kanals sowie durch die Modulation der Porenaktivität erfolgen. Durch Ko-Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen oder potentialabhängigen nicht Ca^{2+} -leitenden Kanälen kann ein räumlich und zeitlich orchestriertes Ca^{2+} -Signal entstehen, das Spezifität zwischen Input- und Outputsignal für die Zelle definiert.

1.3 Zusammenfassung und Hypothese

Aus seinen vielfältigen Funktionen wird klar, welche herausragende Rolle das RPE für den Visuserhalt spielt und wie gravierend sich Störungen und vor allem irreversible Schäden des RPE auswirken können.

Ziel der Arbeiten zu der Habilitationsschrift ist es, das RPE als ein Interface zwischen der Retina und dem Körperkreislauf zu charakterisieren.

Die zentrale Frage für diese Arbeit ist: Handelt es sich beim RPE nicht nur um eine rein mechanische Barriere, die durch die Dichtigkeit des Epithels besteht, sondern um ein Epithel, welches aktiv und gezielt Kommunikation mit den Nachbargeweben steuert?

Zur Beantwortung dieser Frage haben wir die Hypothese, dass das RPE durch sekretorische Beeinflussung des VEGF-Signalsystems angiogene als auch inflammatorische Prozesse in der äußeren Netzhaut steuert.

Um die Hypothese zu prüfen, sollen folgende Fragen zur Kommunikation des RPE mit den Nachbargeweben beantwortet werden:

1. Welche ionalen Mechanismen regulieren die VEGF-A Sekretion?
2. Welche Rolle spielt die VEGF-Superfamilie bei der Koordination von Angiogenese und Immunabwehr?

2 ORIGINALARBEITEN

Die Originalarbeiten ermöglichen mit der Identifizierung neuer Ionenkanäle ein verbessertes Verständnis für die funktionale Regulation der bekannten Ionenkanäle. Basierend auf diesen Daten konnten wesentliche Aspekte der RPE Funktion, vor allem der der Sekretion, verstanden werden und in ein pathologisches Szenario eingeordnet werden.

2.1 Anoctamin2 (TMEM16B) forms the Ca^{2+} -activated Cl^- channel in the retinal pigment epithelium.

Der Cl^- -Transport durch das RPE spielt eine wichtige Rolle für die retinale Ionen- und Flüssigkeitshomöostase. Für den Eintritt von Cl^- in die RPE Zellen sorgt ein $\text{Na}^+/\text{K}^+ - 2 \text{Cl}^-$ -Co-Transporter. Da Na^+ und K^+ die RPE Zellen durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und apikalen K^+ Kanäle über die apikale Membran in Richtung Retina wieder verlassen, kommt es über den $\text{Na}^+/\text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Co-transporter und der Impermeabilität der apikalen Membran für Cl^- zu einer hohen intrazellulären Cl^- Konzentration. Zum Zweck des transepithelialen Cl^- -Transports werden in der basolateralen Membran des RPE zahlreiche Cl^- -Kanäle exprimiert (Gallemore et al., 1988; Gallemore & Steinberg, 1989), über die das Cl^- über die basolaterale Membran in Richtung Blutseite abfließen kann. Ferner regulieren Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle die zeitliche und räumliche Ausbreitung von Ca^{2+} -Signalen und damit generelle Steuerungen der Zellfunktion (Berridge et al., 2000). Neben dem spannungsabhängigen Cl^- -Kanäle (CIC-2 (Bösl et al., 2001; Wills & Fong, 2001) wurde die Existenz Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanäle (CaCC) im RPE mittels Patch-Clamp, Messung transepithelialen Transports und pharmakologischer Intervention schon früh nachgewiesen, ein molekulares Korrelat konnte allerdings bis zum Zeitpunkt dieser Forschungsarbeiten nicht gefunden werden (Reichhart & Strauss, 2014). Vor allem die Abhängigkeit vom Ca^{2+} -Spiegel und somit das Potenzial den Cl^- -Transport an metabolische Gegebenheiten anzupassen ist hier

physiologisch sowie pathophysiologisch hoch relevant. Bisher bekannt waren der cAMP-abhängige CFTR (Blaug et al., 2003) sowie das Ca^{2+} -abhängige Protein Bestrophin-1 (BEST1) (Chien et al., 2006; Hartzell et al., 2008; Sun et al., 2002).

Anoctamine stellen eine Familie von Transmembranproteinen dar, welche sowohl Ionenkanalfunktion aufweisen, je nach Subtyp auch als Scramblasen fungieren (Kunzelmann et al., 2012; Pedemonte & Galletta, 2014; Picollo et al., 2015). Scramblasen sind für die Translokation von Phospholipiden innerhalb Zellmembranen zuständig (Kodigepalli et al., 2015). Anoctamin (Ano)1 und Ano2 wurden als erste aus dieser Familie identifizierte Proteine sowohl heterolog als auch endogen exprimiert als CaCCs beschrieben. Ano1 ist wichtig für die Sekretion im gastrointestinalen Epithel und im Bronchialepithel sowie in Speicheldrüsen und Pankreas (Schreiber et al., 2010). Knock-out (KO) von Ano1 führt in Bronchien zu einem der cystischen Fibrose vergleichbaren Phänotyp mit Störung der Mucus-Sekretion, wobei Ano1 bei cystischer Fibrose überexprimiert wird und durch die relativ hohe Expression in glatten Muskelzellen sowie Mucus-produzierenden Zellen und die relativ niedrige Expression in Bronchialepithelzellen das Krankheitsbild partiell aggraviert (Hahn et al., 2018; Kunzelmann et al., 2019). Ano2 ist vor allem in neuronalen Geweben exprimiert und der Transduktion der Signale aus der Retina und den Haarzellen beteiligt. In der Retina ist an der Feinjustierung des synaptischen Potentials zur Verbindung zum zweiten Neuron abhängig von Ano2. Zudem gibt es Hinweise, dass Ano2 in den Haarzellen des Innenohrs die Sensitivität reguliert (Pifferi et al., 2012; Stöhr et al., 2009). Initial wurde Ano2 als Kanal in der Photorezeptorsynapse identifiziert, deren Ca^{2+} -Signale vom extrazellulären Cl^- abhängig sind (Pedemonte & Galletta, 2014).

Auch wenn in heterologer Expression ein anderes Bild entstand, hat die Analyse des anderen Ca^{2+} -abhängigen Cl^- Kanals, dem Bestrophin-1, bisher wenig robuste Daten aus der Untersuchung endogener Best1 Expression von RPE Zellen ergeben. Eine direkte Beteiligung des Bestrophin-1 an der Cl^- -Leitfähigkeit des RPE ist nicht eindeutig bewiesen worden. Somit stellt Ano2 ein vielversprechendes mögliches molekulares Korrelat für den bislang nicht identifizierten CaCC im RPE dar.

Keckeis et al., 2017: Anoctamin2 (TMEM16B) forms the Ca²⁺ activated Cl channel in the retinal pigment epithelium. Exp Eye Res, 2017.154:p.139-150.

„Chloridkanäle (Cl Kanäle) spielen eine essentielle Rolle für das retinale Pigmentepithel (RPE). Sie bieten eine Plasmamembranleitfähigkeit für Cl⁻, die wichtig ist für den transepithelialen Transport und die Volumenregulation. Es konnte gezeigt werden, dass Ca²⁺-abhängige Cl Kanäle (CaCC) im RPE den Cl Transport an spezifische Bedürfnisse durch Anstieg des intrazellulären freien Ca²⁺.

Obwohl eine Vielzahl von Cl Kanälen im RPE identifiziert wurden bleibt die molekulare Identität der CaCC kontrovers. Sagittalschnitte der Mausretina wurden gefärbt gegen anoctamin 2 (Ano2) und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Membranströme von ARPE-19 Zellen und primärem Maus-RPE wurden in der Whole–Cell Konfiguration der Patch Clamp Technik gemessen.

Die Expression von Ano2 wurde mittels Immunozytochemie analysiert, PCR und Western Blot und herabreguliert mittels siRNA. In der Mausretina wurde Ano2 in der basolateralen Membran des RPE gefunden. In primären Maus-RPE-Zellen war Ano2 überwiegend in der Zellmembran lokalisiert. Ano2 mRNA und Protein wurden auch in Ratten- und Primaten-RPE als auch in ARPE19 Zellen detektiert. Whole-Cell Ströme wurden durch Anstieg des intrazellulären freien Ca²⁺ durch ATP-Applikation ausgelöst.

Diese Ströme konnten durch ihr Umkehrpotenzial und die Blocker-Sensitivität als Cl Ströme identifiziert werden. Herabregulation von Ano2 durch siRNA setzte sowohl die Ca²⁺ abhängige Chloridleitfähigkeit und Proteinexpression von Ano2 herab. Die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaftender CaCC in ARPE-19 Zellen und primären Maus RPE-Zellen ähneln jenen in vorherigen Publikationen die RPE Zellen verschiedener Spezies verwendeten. Der siRNA Knock-down deutet darauf hin, dass Ano2 zur Ca²⁺ abhängigen Chloridleitfähigkeit beiträgt.“

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.12.003>

2.2 Anoctamin-4 is a bona fide Ca^{2+} -dependent non-selective cation channel

Schon zu den Anfängen der Patch-Clamp Untersuchungen der Ionenkanäle des RPE gab es Hinweise für eine Ca^{2+} -abhängige, Fenamat-sensitive Kationenleitfähigkeit, jedoch blieb die Identifikation eines molekularen Korrelats dafür bisher aus. Applikation des Ca^{2+} -Ionophores Ionomycin oder von ATP führte in vitro zu einer Zunahme der Äquivalentleitfähigkeit von RPE-Zellen (Ryan et al., 1999; Tao & Kelly, 1996). ATP als physiologischer Stimulus dient im RPE vor allem der Regulation der Phagozytose und des transepithelialen Cl^- Transportes (Mitchell & Reigada, 2008).

Anoctamine kommen als Vermittler Ca^{2+} -abhängiger Leitfähigkeit im RPE in Frage. Anders als Ano1 und Ano2, welche als CaCC in zahlreichen Epithelien, wie auch dem RPE (siehe 2.1) beschrieben wurden, gelten die anderen Anoctamine, hier vor allem 3, 4, 6, 7 und 10 (Pedemonte & Galletta, 2014; Whitlock & Hartzell, 2017) als vorwiegend scamblierende Anoctamine. Scramblasen sind Enzyme, die Phospholipide der Lipiddoppelschicht von der inneren in die äußere Schicht und umgekehrt transportieren (Kodigepalli et al., 2015). So führt eine Mutation von Ano6 zu einer verminderten Thrombinbildung und somit zu einer insuffizienten Blutgerinnung. Grundlage des Defekts ist ein Versagen der Scramblasenfunktion von Ano6, welche für die Initiierung der Gerinnungskaskade essentiell ist (Yang et al., 2012). Einige dieser Anoctamine, so z.B. Ano6 besitzen zudem teilweise unspezifische Kationenkanalfunktion (Martins et al., 2011; Schreiber et al., 2010), die jedoch in unterschiedlichen Publikationen nicht einheitlich bestätigt wurde. Diese Funktion als unspezifische Kationenkanäle wurde bis dato für die Anoctamin-Familie noch nicht systematisch untersucht.

Wir gehen davon aus, dass es sich bei Ano4 um einen Ca^{2+} -abhängigen Kationenkanal handelt und dieser das molekulare Korrelat für den bis dato unbekanntenen Ca^{2+} -abhängigen Kationenkanal im RPE darstellt.

Reichhart et al., 2019: Anoctamin-4 is a bona fide Ca(2+)-dependent non-selective cation channel. Sci Rep, 2019. 9(1): p. 2257.

„Veränderungen in der Zellfunktion treten auf aufgrund spezifischer Muster von intrazellulärem Ca²⁺, welches Ca²⁺-sensitive Proteine aktiviert. Die Anoctamin (TMEM) Familie hat Ca²⁺-abhängige Ionenkanal-Aktivität, welche transmembranären Ionentransport und/oder Ca²⁺-abhängige Phosphatidyl-Scramblase ermöglicht. Mittels Aminosäuresequenzanalyse kombiniert mit der Messung der Ionenkanalfunktion konnten wir die bis dato unbekannte Ano4 Funktion als Ca²⁺-abhängiger nicht selektiver Kanal für monovalente Kationen eruieren; heterologe Ano4-Expression in HEK293-Zellen ruft Ca²⁺-aktivierte Leitfähigkeit mit schwacher Selektivität für K⁺>Na⁺>Li⁺. Endogen exprimierte Ca²⁺-abhängige Kationenkanäle im retinalen Pigmentepithel wurden als Ano4 identifiziert durch primäre RPE Zellen von KO-Mäusen und siRNA gegen Ano4. Der Austausch einer negativ geladenen Aminosäure in der mutmaßlichen Porenregion (AA 702-855) in eine positiv geladene (E775K) wandelt Ano4 hervorgerufene Ströme in Chloridkanäle um, ein Beweis für die Bedeutung für die Ionenselektivität. Die molekulare Identifizierung von Ano4 als Ca²⁺-aktivierter Kationenkanal verbessert das Verständnis seiner Rolle im Ca²⁺-Signaling.“

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37287-y>

2.3 Prediction of functional consequences of missense mutations in ANO4 Gene

Die Funktion des Ano4 hat bisher mangels krankheitsrelevanter Funktionsveränderungen im Sinne einer „Channelopathy“ wenig Beachtung gefunden. Mittels bioinformatischer Methoden ist es möglich, Vorhersagen über die Auswirkung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single-nucleotide polymorphism, SNP), auf die Stabilität eines Proteins zu treffen. So kann schon *in silico*, also vor der Klonierung, abgeschätzt werden ob bestimmte Mutationen einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben werden oder nicht. Im Falle von Ano4 ist bekannt, dass bestimmte SNPs mit dem Auftreten von Erkrankungen des ZNS sowie bestimmter Drüsen – entsprechend dem Proteinexpressionsprofil von ANO4 - assoziiert sind (Athanasias et al., 2010; Hendrickx et al., 2017; Maniero et al., 2015, 2019; Sherva et al., 2020; Terracciano et al., 2010; Webb et al., 2012; Wittkowski et al., 2018).

Da es derzeit noch keine Röntgenstruktur von humanem Ano4 gibt, wurde ein Homologie-Modell, basierend auf dem murinen Ano4 erstellt. Die Sequenzhomologie von 54% stellt eine solide Basis für eine verlässliche Vorhersage dar (Agrahari et al., 2018; Agrahari, Doss, et al., 2019; Agrahari, Krishna Priya, et al., 2019; Agrahari, Pieroni, et al., 2019). Mittels verschiedener Algorithmen zur Vorhersage der Auswirkung eines Einzelnukleotid-Austausches auf die Proteinstruktur wurden die 4 häufigsten potentiell instabilen Polymorphismen identifiziert und dem Homologie-Modell zugeordnet. Diese befanden sich allesamt im evolutionär hoch konservierten Teil von ANO4.

Mittels Molekularer Dynamiksimulation (MDS) wurde errechnet, wie sich diese „Missense“ Mutationen auf die Stabilität des mutanten ANO4-Proteins auswirken. Hierzu wurden mehrere Parameter wie root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF), radius of gyration (RG), solvent-accessible surface area (SASA) und Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Hierbei zeigten vor allem 2 der 4 untersuchten Mutationen signifikant erhöhte Werte für die RMSD im Vergleich zu wildtypischem ANO4, was auf eine verringerte Stabilität des jeweiligen Proteins hinweist. Dies kann zu einer Beeinträchtigung der Funktion des Proteins

führen. Es konnte durch die *in silico* Untersuchung die Tür zu einer möglichen pathologischen Funktion RPE aufgeschlagen werden.

Reichhart et al., 2021: Prediction of functional consequences of missense mutations in the ANO4 gene. Int J Mol Sci. 2021 Mar 8;22(5):2732.

„Die Anoctamin (TMEM16) Familie der Transmembranproteine besteht bei Wirbeltieren aus 10 Mitgliedern, die als Ca²⁺ abhängige Ionenkanäle und /oder Ca²⁺-abhängige Scramblasen agieren. ANO4, welches primär im ZNS und bestimmten endokrinen Drüsen exprimiert wird, wurde mit verschiedenen neuronalen Erkrankungen assoziiert. Deshalb konzentrierten wir unsere Studie priorisierend auf Missense-Mutationen, von denen angenommen wird, dass sie die Struktur und Stabilität des ANO4 Proteins ändern. Wir verwendeten ein weites Spektrum von Evolutionsbasierten und strukturbasierten Vorhersagemethoden um potentiell zerstörerische Missense-Mutationen im ANO4 Gen zu identifizieren. Identifizierte pathogene Mutationen wurden dann in der modellierten humanen ANO4 Struktur abgebildet und die Effekte der Missense-Mutationen wurden auf atomarem Niveau mittels Simulation molekularer Dynamik untersucht. Unsere Daten zeigen, dass die G80A und A500T Mutationen signifikant die Stabilität der mutierten Proteine verändern und so eine neue Perspektive für die Rolle von Missense- Mutationen im Ano4 Gen bieten. Die Ergebnisse dieser Studie werden vielleicht helfen, Krankheits-assoziierte Mutationen zu identifizieren die die ANO4 Protein-Struktur und –Funktion betreffen und die zukünftige funktionelle Charakterisierung von ANO4 erleichtern.“

<https://doi.org/10.3390/ijms22052732>

2.4 Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium

Wie schon einleitend kurz angesprochen sezerniert das RPE eine große Zahl an Wachstumsfaktoren sowohl apikal in Richtung Photorezeptoren als auch basolateral in Richtung Chorioidea.

Der Prozess der Sekretion in epithelialen Zellen besteht aus der regulierten Produktion des Sekrets, dessen Transport zur Plasmamembran, eventuelles Anlegen von sekretorischen Vorratsspeichern sowie der Freisetzung des zu sezernierenden Stoffes (Burgoyne & Morgan, 2003). Ca^{2+} dient der Genregulation, steuert den Transport und ist Trigger für die Freisetzung (Anantharam & Kreutzberger, 2019; Karlstad et al., 2012). Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} kann sowohl durch vermehrten Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen geschehen, als auch durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (Karlstad et al., 2012; Reichhart & Strauss, 2014).

Als molekulare Korrelate für die Ca^{2+} -Kanäle in RPE-Zellen kommen Transient receptor potential (TRP) Kanäle in Frage. Aus der Familie der TRP-Kanäle konnten bislang TRPC1, TRPC4 sowie TRPV1-6 im RPE nachgewiesen werden (Cordeiro et al., 2010; Kennedy et al., 2010; Wimmers et al., 2007). TRPC1 und 4 tragen zum basalen Ca^{2+} -Einstrom bei, welcher essentiell ist für die Aufrechterhaltung der vielfältigen Ca^{2+} -abhängigen Funktionen des RPE. Die TRPV1-4 gehören zu den sog. thermo TRPs, thermosensitiven Kationenkanälen, welche durch unterschiedliche Temperaturen aktiviert werden können (Vay et al., 2012). Durch den generellen multimodalen Aktivierungsmodus aller TRP-Kanäle muss sich die Hauptfunktion der TRPV-Kanäle nicht auf deren Temperaturabhängigkeit beschränken.

TRPV2-Kanäle, sind Kationenkanäle, die klassischerweise durch Temperaturanstiege über 52°C aktiviert werden; allerdings existieren auch hitzeunabhängige alternative Aktivierungsmechanismen wie osmotischer Stress, mechanische Reize (Caterina et al., 1999; Muraki et al., 2003), sowie intrazelluläre Aktivierungsmechanismen via G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Cannabidiol (CBD) (Barro-Soria et al., 2012; Qin et al., 2008) und IGF-1 (Cordeiro et al., 2010; Kanzaki, Nagasawa, et al., 1999), sind hier wichtige Agonisten.

Cordeiro et al. konnten u.a. in RPE-Zellen zeigen, dass TRPV2 exprimiert wird und eine kurzzeitige nur wenige Sekunden dauernde Temperaturerhöhung auf 56°C oder die Gabe von IGF-1 zu einem Anstieg der VEGF-A-Sekretion führen (Cordeiro et al., 2010).

In diesem Manuskript sollte genauer analysiert werden, wie TRPV2 durch IGF-1 bzw. CBD reguliert wird, wobei ein Fokus auf direkter Beeinflussung der Kanalaktivität und möglicher Translokation des TRPV2 Kanalproteins an die Zelloberfläche lag.

Reichhart, Keckeis, et al., 2015: Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2015. 253(6): p. 865-74

„Zweck: Das retinale Pigmentepithel (RPE) interagiert mit den Photorezeptoren bei der Erfüllung von Aufgaben der visuellen Funktion. Da ein Verständnis der RPE Funktion essentiell für das Verstehen der Patho-Mechanismen die in den Visusverlust involviert sind, haben wir die Regulation von Vanilloid- Rezeptor Subtyp Transient Receptor Potential TRPV2 Kanälen, die insulin like growth factor (IGF-1) induzierte vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) Sekretion triggern, untersucht.

Methoden: Immunhistochemie wurde verwendet um TRPV2 Expression in Retinaschnitten oder ARPE19-Zellen untersucht und die Oberflächenexpression von TRPV2 wurde mittels konfokaler Mikroskopie quantifiziert. Membranströme von ARPE-19 Zellen wurden aufgenommen in der Whole-Cell Konfiguration der Patch-Clamp-Technik.

Ergebnisse: TRPV2 Expression wurde im RPE der Mäuseretina und in ARPE-19 Zellen detektiert. Ein Temperaturanstieg auf 45°C aktiviert eine Membranleitfähigkeit die empfindlich reagiert auf SKF-96365 und Ruthenium Rot in 60% der Zellen. Präinkubation mit Cannabidiol (CBD) oder IGF-1 führte zu einem 3- oder 4-fachen Anstieg der Stromdichte in allen Zellen; dieser Anstieg wurde durch SKF-96365 blockiert. Im Gegensatz zu IGF-1 konnte die Membranleitfähigkeit nach CBD-Stimulation durch Hitze noch weiter gesteigert werden. TRPV2-Oberflächenexpression wurde sowohl durch IGF-1 als auch CBD gesteigert, wobei der Anstieg durch CBD zweimal so groß war wie bei IGF-1. Der Phosphatidylinositol 3-Kinase- (PI3K) Inhibitor LY294002 egalisierte die Effekte auf die Membranleitfähigkeit und die Oberflächenexpression.

Schlussfolgerung: CBD und IGF-1 erhöhen die TRPV2 Kanalaktivität durch spezifische Anteile von Kanalaktivierung und PI3K-abhängiger Oberflächenexpression: IGF-1 steigert vorrangig die Ionenkanalaktivität, wohingegen CBD mehr die TRPV2 Oberflächenexpression erhöht. Also ist die differentielle Regulation der TRPV2 Oberflächenexpression ein wichtiger Mechanismus, um die Reagibilität des RPE auf Wachstumsfaktoren zu modulieren.“

<https://doi.org/10.1007/s00417-014-2917-7>

2.5 Rab27a GTPase modulates L-type $\text{Ca}_v1.3$ channel function via interaction with the II-III linker of $\text{Ca}_v1.3$ subunit

Wie bereits einleitend beschrieben, kommt dem neuroendokrinen Ca^{2+} -Kanal im RPE eine Schlüsselrolle im Sekretionsprozess verschiedener Wachstumsfaktoren wie VEGF-A zu. Als möglicher Interaktionspartner des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals im RPE könnte Rab27a so die Sekretionsfunktion des RPE modulieren (Futter et al., 2004). Rab27a co-lokalisiert mit der porenbildenden Einheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals in der basolateralen Membran des RPE von Mäusen. Eine Unterdrückung der Aktivitätssteuerung von Rab27a durch Mutationen im Rab-Escortprotein-1 (REP) führt zu Fehlbildungen der Chorioidea (Chorioderemie), was möglicherweise durch eine verminderte Sekretion von VEGF-A zurückzuführen ist. Somit war das Ziel der Studie herauszufinden, ob bzw. wie Rab27a die Funktion von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und in einem zweiten Schritt die VEGF-A Sekretion des RPE beeinflusst.

Reichhart, Markowski, et al., 2015: Rab27a GTPase modulates L-type Ca^{2+} channel function via interaction with the II-III linker of $\text{Ca}_v1.3$ subunit. *Cell Signal*, 2015. 27(11): p. 2231-40

„In einer Vielzahl von Zellen benötigen die sekretorischen Prozesse die Aktivierung von Rab27a und L-Typ Kanälen des $\text{Ca}_v1.3$ -Subtyps. Im retinalen Pigmentepithel (RPE) regulieren Rab27a und $\text{Ca}_v1.3$ Kanäle die Sekretion von Wachstumsfaktoren an der basolateralen Seite. Die Analyse von Retinaschnitten der Maus ergab eine Ko-Lokalisation von Rab27a und $\text{Ca}_v1.3$ an der basolateralen Membran des RPE. Heterolog exprimierte $\text{Ca}_v1.3/\beta_3/\alpha_2d$ Kanäle zeigten eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu negativeren Potentialen und um 70% verminderte Stromdichte bei Ko-Expression mit Rab27a. Die Ko-Lokalisationsanalyse mit $\alpha_5\beta_1$ -integrin als Plasmamembranmarker zeigte, dass Rab27a-Ko-Expression die Oberflächenexpression von $\text{Ca}_v1.3$ nur um 10% reduzierte. Die Bindung von heterolog exprimiertem Rab27a mit $\text{Ca}_v1.3$ Kanälen wurde mittels Ko-Lokalisation und Co-Immunopräzipitation gezeigt, die nach Deletion einer MyRip-homologen Aminosäure-Sequenz im Bereich der II-III Verbindung der $\text{Ca}_v1.3$ Untereinheit aufgehoben war. Rab27a Überexpression in ARPE19-Zellen verschob die Spannungsabhängigkeit zu positiveren Potentialen, verminderte die Stromdichte endogener

Ca_v1.3 Kanäle und reduzierte die VEGF-A Sekretion. Wir zeigen den ersten Nachweis einer direkten funktionellen Modulation einer eines Ionenkanals durch Rab27a, was auf einen neuen Mechanismus der Rab- und Ionenkanal-Interaktion bei der Kontrolle der VEGF-A Sekretion im RPE hinweist.“

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.07.023>

2.6 Inhibition of Placenta Growth Factor Reduces Subretinal Mononuclear Phagocyte Accumulation in Choroidal Neovascularization.

Die Funktionen des RPE bedingen das Immunprivileg der Retina. Dies geschieht nicht nur passiv aufgrund der Barrierefunktion, sondern auch aktiv durch die Sekretion immunmodulierender Faktoren (Streilein, 2003; Streilein et al., 2002).

Physiologisch als auch pathophysiologisch ist die Sekretion von VEGF-A von besonderer Wichtigkeit. Die Aktivität der VEGF-Sekretion und somit die Konzentration von VEGF-A im RPE-Chorioidea-Komplex ist essenziell für das Entstehen und die Reifung retinaler Gefäße während der Entwicklung (Ferrara, 2009). Im gesunden Auge ermöglicht VEGF-A über parakrine Stimulation die Aufrechterhaltung der Integrität des RPE-Chorioidea Komplexes und die der Fenestrierung der Kapillaren in der Chorioidea (Blaauwgeers et al., 1999). Des Weiteren ist VEGF-A jedoch bei verschiedenen okulären Pathologien, welche mit retinalen Neovaskularisationen einhergehen, von Bedeutung, wie zum Beispiel bei der feuchten Form der AMD oder bei der proliferativen diabetischen Retinopathie (Witmer et al., 2003).

Placenta Growth Factor (PGF) ist ein Faktor welcher Angiogenese und Immunmodulation verbindet. PGF ist ähnlich wie VEGF-A ein Wachstumsfaktor, welcher vom RPE sezerniert wird (Klettner et al., 2015). Im Gegensatz zu VEGF-A welches über die Aktivierung der Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 wirkt, bindet PGF ausschließlich an VEGFR1 (Claesson-Welsh, 2016). Die VEGFR2 Expression beschränkt sich im physiologischen Kontext vorwiegend auf Endothelzellen, während VEGFR1 auch auf Müllerzellen, Ganglienzellen, Perizyten, RPE Zellen und Immunzellen exprimiert wird (Cai et al., 2012; Huang et al., 2013; Stewart et al., 2011). Unter den Immunzellen spielen in der erkrankten Retina vor allem mononukleäre Phagozyten (MP), residente Mikroglia und systemische Monozyten, welche unter pathologischen Bedingungen einwandern, eine wichtige Rolle.

Die Rolle der VEGF-A-VEGFR2-Interaktion durch die direkte Wirkung auf Gefäßendothelien für die Entstehung der Neovaskularisation gilt als etabliert und wird erfolgreich mittels der anti-VEGF-A

Therapie klinisch bei feuchter AMD verwendet wohingegen über die Bedeutung von PGF und VEGFR1 bei der AMD weit weniger bekannt ist. Fallstudien zeigen, dass die kombinierte anti-VEGF-A und anti-PGF Therapie bei Patienten, welche unter anti-VEGF-A Therapie-refraktär sind bzw. bei denen es zu einem sekundären Therapieversagen kommt, effektiv ist (Azuma et al., 2018; Cho et al., 2013; Fassnacht-Riederle et al., 2014; Fujii et al., 2014; Grewal et al., 2014; Kawashima et al., 2015; Messenger et al., 2014; Michalewski et al., 2014; Patel et al., 2013; Pinheiro-Costa et al., 2015; Ricci et al., 2017; Spooner et al., 2017; Unsal & Cubuk, 2018; Wykoff et al., 2014; Yonekawa et al., 2013). Eine mögliche Erklärung dafür besteht in der Wirkung der PGF-vermittelten VEGFR1 Aktivierung auf das Immunsystem, das für die Pathogenese der AMD unumstritten ist (Copland et al., 2018; Guillonnet et al., 2017). Mittels VEGFR1 Neutralisation bzw. PGF KO-Mäusen konnte Rakic et al zeigen, dass im Modell der Laser-induzierten CNV PGF essenziell für die Ausbildung von Neovaskularisation ist (Rakic et al., 2003).

Um die zellulären Mechanismen der Interaktion zwischen PGF und den MP zu untersuchen wurden MacGreen Mäuse verwendet, in welchen alle myeloischen Zellen (CSF1R positiv) GFP exprimieren und so mittels Bildgebung leicht identifiziert werden können.

Crespo-Garcia et al., 2017: Inhibition of Placenta Growth Factor Reduces Subretinal Mononuclear Phagocyte Accumulation in Choroidal Neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017. 58(12): p. 4997-5006.

„Zweck: Die zelluläre Immunantwort vermittelt durch mononukleäre Phagozyten (MPs) ist entscheidend für das Fortschreiten der chorioidalen Neovaskularisation (CNV). Fallberichte zeigen, dass ein Wechsel von einer reinen anti vascular endothelial growth factor (VEGF-A) intravitrealen Behandlung zu Aflibercept, einem Medikament mit kombinierter anti-VEGF-A und anti-placental growth factor (PlGF) Aktivität für Patienten die nicht auf anti-VEGF-A Behandlung allein reagieren, vorteilhaft sein kann. Da MPs VEGFR1 besitzen verfolgen wir die Hypothese, dass das Zusammenspiel von PlGF/vascular endothelial growth factor 1 (VEGFR1) in Immunzellen eine zentrale Rolle für die CNV spielt

Methoden: CNV wurde induziert mittels Laser und Immunzellen und Neovaskularisation wurden *in vivo* und *ex vivo* analysiert. Immunhistochemie wurde zur Proteinexpression verwendet.

Differentielle Expression angiogener Faktoren und Polarisationsmarker der Makrophagen wurden durch quantitative PCR (qPCR) analysiert. Ein Tag nach Laserintervention wurde Aflibercept oder anti-PIGF intravitreal injiziert.

Ergebnisse: In der frühen entzündlichen Phase nach Laser war PIGF aber nicht VEGF-A signifikant hochreguliert. VEGF-A-Hochregulation ist beschränkt auf die Narbe, wohingegen PIGF eine diffuse Verteilung zeigt. M1 (pro-inflammatorische) Makrophagenmarker waren hochreguliert in der frühen Phase der CNV. M2 (pro-angiogene) Marker zeigten inkonsistentere Dynamik. Wie zeigten, dass sowohl Aflibercept und anti-PGF Behandlungen vermindern die Gesamtheit der aktivierten subretinalen MPs und besonders derer, die PIGF exprimieren. Diese Daten korrelieren mit einer Reduktion der Leckage bei der CNV. Aflibercept zeigte eine stärkere Verminderung beider Parameter.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse weisen auf ein Zusammenspiel zwischen PIGF/VEGFR1 und MPs, welches wichtig ist in der Frühphase der CNV. Eine kombinierte Blockade von VEGF-A und PIGF ist einer spezifischen anti-PIGF Behandlung in Bezug auf die Rekrutierung von subretinalen MPs überlegen.“

Somit konnte gezeigt werden, dass vor allem in der frühen Phase der chorioidalen Neovaskularisation das Zusammenspiel von PGF und dessen Rezeptor VEGFR1 mit den MP eine wichtige Rolle für die Pathologie spielt. Da das RPE mit seiner VEGF-A Sekretion in dieses Szenario eingreifen kann, belegt diese Studie die translationale Relevanz der Untersuchungen zur Steuerung der Sekretion durch das RPE.

<https://doi.org/10.1167/iavs.16-21283>

3 DISKUSSION

3.1 Das RPE als aktive Barriere: ionale Mechanismen der Sekretionssteuerung

VEGF-A ist nicht nur ein Faktor der Angiogenese, er ist auch Bestandteil der Koordination der bei einer Verletzung notwendigen Immunreaktionen. Das heißt, auch die Kontrolle der VEGF-A Sekretion durch das RPE ist ein Bestandteil der Erhaltung des Immunprivilegs der Netzhaut. Die unter 2.1-2.5 beschriebenen Publikationen erweitern das Bild der Ca^{2+} -abhängigen Mechanismen, die die VEGF-A Sekretion steuern. Die Publikation 2.6 zeigt, wie das VEGF-Signalsystem über die Stimulation der VEGF Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 Neovaskularisation und damit verbundene Entzündungsprozesse in der äußeren Netzhaut koordiniert.

Ca^{2+} -Signaling als Basis: In bisherigen Studien sind die Ca^{2+} -leitenden Kanäle $\text{Ca}_v1.3$ und TRPV2 als hauptsächliche Mediatoren für die VEGF-A Sekretion im RPE identifiziert worden. Diese Beobachtung diente als Basis für die vorliegenden Studien des Modells des Ca^{2+} -Signalings im RPE und wie dieses zu einer vermehrten VEGF-A Sekretion bei der neovaskulären Form der AMD beiträgt (Reichhart & Strauss, 2014; Wimmers et al., 2007). Zwei wesentliche Mechanismen konnten hier neu zum Verständnis dieser Prozesse hinzugefügt werden: die Rolle der Anoctamine im RPE und die Regulation der Oberflächen-Expression von $\text{Ca}_v1.3$ sowie TRPV2. Mit der molekularen und funktionellen Charakterisierung des Kanalproteins TRPV2 konnte eine wichtige Determinante der sekretorischen Aktivität des RPE näher erforscht werden, welche direkt über den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle die Sekretion erhöht. IGF-1-Rezeptoren werden vom RPE exprimiert (Moriarty et al., 1994; Rosenthal et al., 2004; Waldbillig et al., 1991) und tragen in bislang unverständlicher Weise zu einer vermehrten Expression/ Sekretion von VEGF-A bei. RPE Zellen aus neovaskulären Membranen des Menschen zeigen eine erhöhte Aktivität der L-Typ Kanäle, einhergehend mit einer erhöhten VEGF-A Sekretion (Rosenthal et al., 2007). Dies belegt die Rolle der L-Typ Kanäle für die Sekretionsleistung des RPE nachhaltig. Bezüglich der Rolle von TRPV2 bei der Sekretion von VEGF-A durch das RPE ist noch nicht viel bekannt.

Aktivierung von TRPV2: Cordeiro et al haben die Aktivierung des TRPV2 durch kurzzeitige Temperaturerhöhung auf Werte über 52° C beschrieben und konnten aber im Patch-Clamp Experiment auch schon Stromerhöhungen durch TRPV2 mit Temperaturpulsen von 42°C messen (Cordeiro et al., 2010). Parver zeigte am isolierten Katzenauge, dass das RPE schon bei schwachen Lichtreizen in Temperaturbereiche von 40° C vorstößt, weswegen eine physiologische TRPV2 Stimulation möglich wäre (Parver, 1991). Noxische Temperaturen über 52°C, der Aktivierungsschwelle von TRPV2 treten im Auge allerhöchstens bei Laserinterventionen auf. Diese Therapieform kommt bei retinalen Blutungen bei proliferativer diabetischer Retinopathie und exsudativer AMD oder aber bei Netzhautforamina zum Einsatz. Dabei nutzt man die anschließende Vernarbung des Gewebes nach thermischer Schädigung, um eine Netzhautablösung zu verhindern. Als möglicher positiver Effekt könnte TRPV2 über die Stimulation der Sekretion durch das RPE maßgeblich zur anschließenden Wundheilung beitragen. Die Tatsache, dass man auf neovaskulären Membranen von AMD-Patienten vermehrt IGF-1 nachweisen konnte (Lambooi et al., 2003; Rosenthal et al., 2004) und *in vitro* durch IGF-1 auch eine vermehrte Sekretion von VEGF-A sowie ein langanhaltenden Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bei den Zellen aus den CNV-Membranen auftrat, legt nahe, dass die Wirkung von TRPV2 auf die Sekretion hier durch IGF-1 und seine Wirkung auf die direkte Aktivität und die Membranlokalisierung von TRPV2 potenziert wurde, was einen bislang unbeachteten möglichen Aggravationsmechanismus bei Fortschreiten der CNV bei AMD darstellt.

3.1.1 Die Anoctamine

Die hier zusammengefassten Arbeiten beschreiben die Expression der Anoctamine Ano2 und Ano4, darüber hinaus wurde die Funktion des Ano4 zum ersten Mal schlüssig geklärt. Da generell noch nicht viel über das Ano4 bekannt ist, konnte eine *in silico* Arbeit eine Vorhersage zur Krankheitsbeteiligung des Ano4 machen und damit die Tür aufstoßen, um die potenziell pathologische Rolle des Ano4 zu definieren.

3.1.1.1 Anoctamin 2 (Ano2)

Ano2 oder ursprünglich TMEM16B wurde zuerst im Zusammenhang mit Photorezeptor-relevanten Genen identifiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass Ano2 ein Protein in der Photorezeptorsynapse ist und in das Proteinnetzwerk zur Steuerung der Glutamatsekretion eingebunden ist. Ferner konnte Ano2 als Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanal identifiziert werden (Stöhr et al., 2009). Da die Amplitude der Ca^{2+} -Signale, die die Glutamatfreisetzung in der Photorezeptorsynapse steuern, von der Konzentration des extrazellulären Cl^- abhängig ist, wurde die Funktion des Ano2 zunächst in der Feinsteuerung von Ca^{2+} -Signalen verortet. Hierbei determiniert das Gleichgewichtspotential für Cl^- die treibenden Kräfte für einen Ca^{2+} -Einstrom und damit möglicherweise dann auch die Stärke der Glutamatfreisetzung (Thoreson et al., 2003; Thoreson & Bryson, 2004), letzteres konnte allerdings noch nicht eindeutig experimentell nachgewiesen werden.

In der Arbeit 2.1 konnte die funktionelle Expression von Ano2 im RPE dargestellt werden. In dieser Arbeit konnten wir durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme mittels externer ATP-Stimulation Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Ströme in der humane RPE Zelllinie ARPE-19 sowie in primären RPE Zellen aus Mäusen aktivieren. Diese waren durch den breit wirksamen Cl^- -Kanalblocker DIDS sowie den spezifischen CaCC-Blocker CaCCinh-A01 hemmbar. Expression von siRNA gegen Ano2 führte zu Reduktion dieser Ströme in ARPE-19 Zellen. Die Ströme ähneln sehr den bereits in der Literatur für RPE Zellen beschriebenen CaCC-Ströme. Neben der verzögerten Auswärtsrektifizierung wie bei (Botchkin & Matthews, 1993; Hartzell & Qu, 2003; Ueda & Steinberg, 1994; Wollmann et al., 2006) beschrieben, war auch die Blockierung durch DIDS, schon in der Literatur unter anderem bei (Botchkin & Matthews, 1993; Hartzell & Qu, 2003; Strauss et al., 1996, 1999; Ueda & Steinberg, 1994; Wollmann et al., 2006) nachweisbar. Die in Studie 2.1 beschriebene ATP-abhängige Aktivierung der Cl^- -Leitfähigkeit konnte bereits direkt in Patch Clamp Messungen an RPE-Zellen aber auch indirekt über die Messung der transepithelialen Transportaktivität der RPE-Zellen für die CaCCs gezeigt werden (Edelman & Miller, 1991; Joseph & Miller, 1991; Leipziger, 2003; Peterson et al., 1997). Zudem konnte Ano2 mittels Immunhistochemie in der basolateralen Membran des RPE lokalisiert werden. Somit ist davon auszugehen, dass Ano2 für einen Teil der

Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Leitfähigkeit verantwortlich ist und durch Erhöhung des freien zytosolischen Ca²⁺ als Second-Messenger die Transportleistung des RPE an metabolische Bedürfnisse der Netzhaut anpassen kann.

3.1.1.2 Anoctamin 4 (Ano4)

Innerhalb der 10 Mitglieder zählenden Familie der Anoctamine ist die Funktion von nur wenigen Mitgliedern der Familie gezeigt worden (Benarroch, 2017; Kunzelmann et al., 2012; Pedemonte & Galletta, 2014). Ano1 und Ano2 sind als Ca²⁺-abhängige Cl⁻-Kanäle sowie als Scramblasen beschrieben worden. Ano6 kann als Ca²⁺-abhängiger nicht-selektiver Kanal für monovalente Kationen beschrieben werden (Kunzelmann et al., 2014; Martins et al., 2011), wobei die Daten in der Literatur nicht eindeutig sind. Allerdings übt Ano6 jedoch vor allem seine Funktion als Scramblase aus. Mutationen in Ano6 sind mit dem Verlust der Gerinnungsfähigkeit beim Scott's Syndrom assoziiert, wobei hier der Verlust der Scramblase-Funktion die entscheidende Rolle spielt (Millington-Burgess & Harper, 2020; Yang et al., 2012). Die Klärung der Funktion weiterer Anoctamine könnte weitere neue Erkenntnisse zu Erkrankungen erbringen. Da Ano4 im RPE exprimiert ist, wurde eine eingehende Funktionsanalyse des Ano4 mittels heterologer Expression, site-directed Mutagenese und Patch Clamp Experimente an nativem RPE von Ano4-KO-Tieren in Arbeit 2.2 durchgeführt und die Funktion des Ano4 als Ca²⁺-abhängiger nicht-selektiver Kanal für monovalente Kationen bewiesen. Diese Funktion könnte eine Lücke im Verständnis der Ca²⁺-abhängigen Regulation der RPE-Funktionen schließen.

Bislang konnte der lange bekannten nicht-selektiven Kationenleitfähigkeit im RPE kein bestimmtes Kanalprotein zugeordnet werden (Ryan et al., 1999; Tao & Kelly, 1996). Die beschriebene Fenamatsensitivität sowie die Zunahme der Leitfähigkeit durch ATP-Gabe identifizieren Ano4 als das entsprechende Protein. Seine Aktivierung durch ATP bestätigt ferner seine Rolle in der Regulation des Ca²⁺-Signaling im RPE.

Das Interesse an der Funktion von Ionenkanälen rückt vor allem bei deren Beteiligung an Pathologien für Erkrankungen, den Channelopathien, in den Vordergrund. Ob Ano4 durch Mutationen bei der Entstehung vererbter Erkrankungen eine Rolle spielen kann, wurde eine *in*

silico Analyse der Mutationsanfälligkeit und destabilisierender Effekte solcher Mutationen in Studie 2.3 durchgeführt. Die beiden Mutationen G80A sowie A500T, welche *in silico* mittels verschiedener Algorithmen sowie mittels MDS als strukturell instabiler als wildtypisches ANO4 identifiziert wurden, sollten kloniert und heterolog exprimiert werden. Es ist spekulativ, ob und wie sich der jeweilige Einzelnukleotidaustausch auf die Stabilität und somit auch auf die Funktion von Ano4 auswirkt. Es besteht die Möglichkeit, dass sich durch den Polymorphismus *in vitro* keine Veränderung der Struktur bzw. Funktion von ANO4 ergibt, allerdings weisen die *in silico* Vorhersagen der Instabilität durchaus eine relevante Verlässlichkeit auf (Agrahari et al., 2018; Agrahari, Doss, et al., 2019; Agrahari, Krishna Priya, et al., 2019; Agrahari, Pieroni, et al., 2019). Bzgl. der sich ergebenden Veränderungen sind verschiedene Szenarien möglich. Es ist möglich, dass das Protein degradiert wird und somit fehlt, es kann schneller abgebaut werden oder der intrazelluläre Transport kann betroffen sein. So könnte es im Fall von ANO4, welches ein unspezifischer Kationenkanal ist, zu einer verminderten Oberflächenexpression kommen und so bei den Patch Clamp Messungen in der Whole-cell Konfiguration in einer verminderten Stromdichte resultieren. Dies konnte für die trunkierte Mutante ano4del1-1150GFP gezeigt werden (Reichhart et al., 2019). Des Weiteren ist eine direkte Funktionsveränderung, z.B im Sinne einer verminderten Stromdichte des Kanals oder einer Veränderung der Ionenselektivität, möglich. Da die Pore der Anoctamine im Bereich der 3.-8. α -Helix liegt (Paulino et al., 2017), könnte A500T hier Auswirkungen haben. Die Studie stützt somit auch weitere Vermutungen an der Beteiligung von Ano4 an verschiedenen Erkrankungen (Athanasiu et al., 2010; Hendrickx et al., 2017; Sherva et al., 2020; Terracciano et al., 2010; Webb et al., 2012).

3.1.1.3 Ano2 und Ano4 im Ca^{2+} -Signaling

Das zeitliche und räumliche Verhalten eines Ca^{2+} -Signals kodiert seinen spezifisch regulatorischen Effekt auf die Zellfunktion. Wie im Modell des Ca^{2+} -Signalings beschrieben, bewirken Ca^{2+} -abhängige Ionenkanäle eine Feinsteuerung des Ca^{2+} -Signals, indem sie die treibenden Kräfte für

einen Ca^{2+} -Einstrom durch Ca^{2+} -leitende Ionenkanäle steuern oder die Aktivität potentialabhängiger Ca^{2+} -Kanäle begrenzen oder erhöhen. Beide Effekte erfolgen durch die Steuerung des Membranpotentials (Berridge et al., 2000).

Ano2 ist schon im Kontext des Ca^{2+} -Signalings der Photorezeptorsynapse als möglicher Modulator identifiziert worden (Stöhr et al., 2009). Im RPE sehen wir die Expression des nahen $\text{Ca}_v1.4$ -Verwandten $\text{Ca}_v1.3$ und Ano2 wodurch eine analoge direkte Interaktion zwischen Ano2 und $\text{Ca}_v1.3$ wie in der Photorezeptorsynapse anzunehmen ist. Da im Gegensatz zur Photorezeptorsynapse RPE Zellen sehr hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentrationen aufweisen (Wiederholt & Zadunaisky, 1984), können wir nicht von einer begrenzenden sondern sogar aktivitätssteigernden Funktion der Parallelaktivierung von Ano2 und $\text{Ca}_v1.3$ ausgehen. Depolarisation aktiviert $\text{Ca}_v1.3$, das einströmende Ca^{2+} durch Ano2, was wiederum die Depolarisation verstärkt und damit die $\text{Ca}_v1.3$ Aktivität. Begrenzend für diesen Effekt dürfte eine weitere Parallelaktivierung des BK-Kanals sein, der zur Hyperpolarisation führt, eine direkte Koppelung von $\text{Ca}_v1.3$ und BK ist nachgewiesen worden (Wimmers et al., 2008). Da Ano4 ähnlich wie Ano2 zur Zelldepolarisation führt ist, die Wirkung auf den $\text{Ca}_v1.3$ entsprechend gleichgerichtet.

Im Falle der Beteiligung des TRPV2, der nicht potentialabhängig ist, würde die Parallelaktivierung von Ano2 und Ano4 den Ca^{2+} -Einstrom durch TRPV2 reduzieren, da die Depolarisation die treibende elektrische Kraft für Ca^{2+} in die Zelle hinein vermindert. In diesem Sinne können Ano2 und Ano4 auch den Einfluss von $\text{Ca}_v1.3$ und TRPV2 auf das zytosolische Ca^{2+} zu Gunsten des $\text{Ca}_v1.3$ separieren. Sind $\text{Ca}_v1.3$ und TRPV2 zeitgleich aktiv, dann wird durch die Parallelaktivierung von Ano2 und Ano4 $\text{Ca}_v1.3$ den größeren Einfluss haben. Die BK-Aktivierung würden hier der funktionelle Antagonist sein. Da beide Kanäle, $\text{Ca}_v1.3$ und TRPV2, die VEGF-A Sekretion steuern, jedoch auf der Basis unterschiedlicher Agonisten, separieren Ano2/Ano4 als auch BK diese Pathways auf der intrazellulären Ebene (siehe Abbildung 4).

3.1.2 Die Oberflächenexpression von Ca_v1.3 und TRPV2

Ionenkanäle können auf zwei Ebenen reguliert werden. Zum einen steht die direkte Aktivierung durch Erhöhung der Porenaktivität durch zum Beispiel Potentialänderung oder einen Co-Faktor wie Ca²⁺ oder cAMP. Diese Form sorgt für die unmittelbare Beteiligung der Ionenkanäle an der Zellfunktion. Zum anderen kann die Zahl der Kanalproteine in der Zellmembran reguliert werden. Dies begründet die generelle Reaktionsstärke, wenn diese Ionenkanäle aktiviert werden. Im Falle der VEGF-A regulierenden Ca²⁺-Kanäle bedeutet eine höhere Anzahl von Kanalproteinen eine stärkere Freisetzung von VEGF-A als Antwort auf einen Stimulus, also eine erhöhte Empfindlichkeit zur VEGF-A Produktion.

Regulation der generellen Reaktionsstärke des RPE, TRPV2 und PI3kinase: Cordeiro et al zeigten, dass TRPV1-4 mRNA im RPE exprimiert wird und IGF-1 durch TRPV2 vermittelt zu einer Erhöhung der VEGF-A Sekretion im RPE führt. Ein Teil dieses Effekts wurde der erhöhten Oberflächenexpression von TRPV2 zugeschrieben (Cordeiro et al., 2010). Wie in der Zusammenfassung zu Publikation 2.4 geschildert kann TRPV2 durch IGF-1 und CBD sowohl direkt aktiviert als auch vermehrt in die Zellmembran eingebaut werden; da sowohl die direkte Aktivierung als auch die Translokation durch LY294002 reduziert wurden, gehen wir von einem PI3kinase abhängigen Mechanismus aus. Die Möglichkeit der Translokation von TRPV2 durch IGF-1 oder CBD wurde bereits für andere Zellen gezeigt (Gailly, 2012; Hassan et al., 2014; Kanzaki, Zhang, et al., 1999; Nabissi et al., 2013).

Regulation der generellen Reaktionsstärke des RPE, Ca_v1.3 und Rab27a: Die Regulation der Sekretion des RPE erfolgt nicht allein durch ionale Mechanismen. Rab-Proteine sind Teil einer Familie von GTPasen, welche unter anderem für den Transport sekretorischer Vesikel essentiell sind. So sind sie zum Beispiel bei der Sekretion von Insulin (Kimura & Niki, 2011; Veluthakal & Thurmond, 2021) oder bei der Immunabwehr mittels zytotoxischer T-Zellen beteiligt (Izumi et al., 2003).

Lange war Rab27a als Protein beschrieben, welches für die Exocytose lytischer Granula notwendig ist. Diese Evidenz fußte vor allem auf der Beobachtung der Immundefizienz bei Patienten mit

Griscelli-Syndrom (Loss of function Mutation von Rab27a) (Bahadoran et al., 2001; Ménasché et al., 2000) oder bei Mäusen mit einer Mutation in Rab27a, welche phänotypisch den Griscelli-Patienten ähneln (Ashen-Mäuse) (Haddad et al., 2001; Hume et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001; Wilson et al., 2000; X. Wu et al., 2001). Dieser Immundefekt beruht auf der insuffizienten Sekretion lytischer Granula durch zytotoxische T-Lymphozyten.

Rab27a ist auch an einer hereditären Erkrankung mit okulärer Manifestation beteiligt. Bei der Chorioideremie handelt es sich um eine X-chromosomal vererbte Erkrankung, welche das RPE, sowie die angrenzenden Schichten Photorezeptoren bzw. Chorioidea) betrifft. Hierfür ursächlich ist eine Mutation des REP-1 (rab escorting protein 1, welches die Aktivierung von Rab GTPasen wie Rab27a mittels Geranylgeranylierung reguliert (Seabra et al., 1993, 1995). Der Pathomechanismus ist bislang noch nicht verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass es möglicherweise über die fehlende Rab27a Wirkung auf den Melanosomentransport zu einem Verlust des Schutzes vor Lichtschäden und in der Folge zu degenerativen Prozessen im RPE kommt (Futter et al., 2004).

Abgesehen von dieser Rolle von Rab27a bei der Exocytose von Lysosomen scheint Rab27a auch bei der exokrinen und endokrinen Sekretion eine wichtige Rolle zu spielen. In Insulin-sezernierenden Zellen des Pankreas reguliert Rab27a das Andocken der Insulingefüllten Granula an die Plasmamembran bei hohen Glucosespiegeln (Kasai et al., 2005; Kimura & Niki, 2011). Rab27a als GTPase interagiert hier, wie auch allgemein bei anderen sekretorischen Prozessen mit weiteren Proteinen der Rab-Familie (vor allem Rab3), Rab-interagierenden Molekülen (RIM) und auch anderen Proteinen wie Granuphilin (Tolmachova et al., 2004) und Myrip (El-Amraoui et al., 2002).

Das RPE als sezernierendes Epithel exprimiert verschiedene Rab-Proteine, darunter Rab3a und Rab27a (Futter et al., 2004). Aufgrund der hohen sekretorischen Aktivität des RPE, liegt eine mögliche Interaktion von Rab27a mit den ebenfalls im RPE exprimierten L-Typ-Ca²⁺-Kanälen nahe.

Mittels Rab27a konnte in Publikation 2.5 ein Molekül als Interaktion des L-Typ-Ca²⁺-Kanals identifiziert werden, welches direkt in die sekretorische Maschinerie involviert ist und somit die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF-A beeinflusst. Generell ergab die

Untersuchung der Interaktion von Rab-Proteinen mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen bislang kontroverse Ergebnisse: Rab11 führt zu einer Verminderung der Ströme durch $\text{Ca}_v1.2$ über eine Induktion der Endozytose dieser Kanäle (Best et al., 2011). Die Rab3 interacting molecules (RIM)1 und 2 interagieren mit „Voltage Dependent Calcium Channels“ (VDCCs) (Gebhart et al., 2010; Kiyonaka et al., 2007). Gandini et al zeigten eine Verlängerung der zeitabhängigen Inaktivierung von VDCCs über Interaktion mit der β -Untereinheit. Während Co-expression mit der $\beta 2$ - oder $\beta 3$ -Untereinheit zu keiner Veränderung der Stromdichte führt, nimmt bei Co-expression mit $\beta 4$ die Stromdichte zu (Gandini et al., 2011). Wir fanden eine direkte vermindernde Wirkung von Rab27a Expression auf die Stromdichte des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals sowie eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu negativeren Potentialen, was die verminderte VEGF-A Sekretion in ARPE-19 Zellen bei Überexpression von Rab27a erklären könnte (Reichhart et al., 2015).

Die in unserer Publikation konstatierte regulatorische Komponente von Rab27a könnte auch zu einer Dysregulation der Sekretion von Wachstumsfaktoren wie VEGF-A führen und so eine Degeneration einleiten. Dieser neue Aspekt könnte helfen, die bislang nicht verstandenen pathophysiologischen Grundlagen der Chorioideremie zu erforschen.

3.1.3 Funktionelle Bedeutung der Anoctamine und Ca^{2+} -Kanäle über die VEGF-A Sekretion hinaus

3.1.3.1 Transepithelialer Transport von Wasser und Cl^-

Neben der Relevanz der Anoctamine und Ca^{2+} -Kanäle für die Sekretion impliziert ihre Expression und Lokalisation auch eine Rolle für eine andere Kardinalfunktion des RPE, den gerichteten Transport von Cl^- und (eng damit verbunden) Wasser. Im Folgenden soll nun die mögliche Rolle der 3 wichtigsten Kandidaten Ano2, Ano4 und $\text{Ca}_v1.3$ für den transepithelialen Transport auf Basis der bestehenden Literatur und der Daten aus den Studien 2.1-5 diskutiert werden.

Ano2

Wie einleitend beschrieben besteht ein aktiver Cl⁻ Transport durch das RPE von der retinalen, apikalen, zur basolateralen, und treibt als Co-transport Wasser in die gleiche Richtung; dies ist essentiell für die Flüssigkeitshomöostase in der Retina und im RPE. Neben CIC-2 als spannungsabhängigen Cl⁻-Kanal ist CFTR als cAMP- abhängiger Cl⁻-Kanal beschrieben. Schon lange ist bekannt, dass bei der Anpassung des Cl⁻-Transports an Stoffwechselprozesse Ca²⁺-abhängige Cl⁻-Kanäle in der basolateralen Membran des RPE involviert sind, deren molekulares Korrelat blieb bislang nur vage: Bestrophin-1, der vielversprechendste Kandidat zeigte in verschiedenen Publikationen widersprüchliche Ergebnisse. Zwar konnte Bestrophin-1 als CaCC *in vitro* in heterologer Expression nachgewiesen werden (Hartzell & Qu, 2003); andere Autoren, unter anderem unsere Arbeitsgruppe, beschreiben Bestrophin-1 jedoch als Modulator spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle sowohl in heterologer Expression als auch in RPE Zellen oder validierten Bestrophin-1 im RPE primär in der Rolle als Regulator der Ca²⁺-Speicher im endoplasmatischen Retikulum (Gómez et al., 2013; Strauß et al., 2014). Als validestes Argument gegen die Theorie des Bestrophin-1 als (alleinigen) CaCC kann Evidenz aus Mausmodellen herangezogen werden. So wiesen Bestrophin-1-KO Mäuse eine Erhöhung des sog. light-peak (LP) auf, welcher indirekt ein Maß für die Cl⁻-Leitfähigkeit der basolateralen Membran des RPE ist (L. Y. Marmorstein et al., 2006), wohingegen knock-in-Mäuse einen reduzierten LP aufwiesen (Zhang et al., 2010).

Die Entdeckung der Anoctamine Ano1/2 als Ca²⁺ abhängige Cl⁻-Kanäle in diversen anderen transportierenden Epithelien (Jang & Oh, 2014; Kunzelmann et al., 2012; Pedemonte & Galletta, 2014; Rottgen et al., 2018) und die Expression von Ano2 in der basolateralen Membran des RPE machte die Hypothese, dass Ano2 das molekulare Korrelat des CaCC im RPE ist, plausibel. Die elektrophysiologischen Charakteristika in heterologer und endogener Expression in primärem murinen RPE fügen sich in die bestehende Evidenz zu Ca²⁺-abhängiger Leitfähigkeit im RPE ein; zusammen mit der deutlichen Verminderung dieser Cl⁻-Leitfähigkeit durch siRNA induzierten knock-down der endogenen Ano2 Expression kann zumindest ein Teil der Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Leitfähigkeit im RPE Ano2 zugeordnet werden und so eine wichtige Lücke zum Verständnis der Physiologie des RPE geschlossen werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass

auch noch andere, bisher unbekannte, Proteine an der Cl^- Leitfähigkeit beteiligt sind. Um die Rolle von Ano2 besser einschätzen zu können wären Messungen der CaCC in Ano2-KO Mäusen hilfreich.

Ano4

Ein Großteil des transepithelialen Transports erfolgt aufgrund des Gradienten für Cl^- über die basolaterale Membran, begleitet von einem gleichgerichteten Wassertransport durch das RPE. Hierzu existiert viel Literatur, welche oben bereits ausführlich diskutiert wurde. Ungleich weniger bekannt und erforscht ist der transepitheliale Transport von K^+ und Na^+ . Wegen des basolateral negativen transepithelialen Potentials des RPE spielt der Kationentransport von apikal nach basolateral zwar mengenmäßig im Vergleich zum Cl^- -Transport eine untergeordnete Rolle, allerdings ist die Pufferfähigkeit des RPE für lichtinduzierte Änderungen der K^+ -Konzentration im subretinalen Raum von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Erregbarkeit der Photorezeptoren (Dornonville de la Cour, 1993; Gallemore et al., 1997; Miller & Steinberg, 1977; Steinberg et al., 1983)². Das Modell des transepithelialen K^+ -Transports könnte folgende Komponenten funktionell miteinander verknüpfen: die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle in der apikalen Membran des RPE, welche durch lichtinduzierte Hyperpolarisation aktiviert werden und Ca^{2+} -abhängige Kationenleitfähigkeit in der basolateralen Membran (Wimmers et al., 2007). Für die Ca^{2+} -abhängige K^+ -Leitfähigkeit in der basolateralen Membran kam lange Zeit vor allem der BK-Kanal in Frage. So fanden einige Gruppen Evidenz für Ca^{2+} -aktivierte auswärtsrektifizierende Ströme (Ryan et al., 1999; Sheu et al., 2004; Sheu & Wu, 2003; Tao & Kelly, 1996) welche durch spezifische BK-Kanal-Blocker gehemmt wurden (Sheu & Wu, 2003; Tao & Kelly, 1996). Die mRNA-Expression von Untereinheiten des BK-Kanals im RPE konnte durch Wimmers et al. gezeigt werden, die Proteinexpression und vor allem die Lokalisation des Kanals ist mangels immunhistochemischer Evidenz nicht eindeutig geklärt (Wimmers et al., 2008).

Hier konnte in der vorliegenden Arbeit 2.2 mit Ano4 ein sehr plausibler Kandidat für das molekulare Korrelat für den Transport monovalenter Kationen in der basolateralen Membran des RPE identifiziert werden. Neben funktionellen Parametern, die den bisherigen Daten zur Ca^{2+} -abhängigen Kationenleitfähigkeit entsprechen (Ryan et al., 1999; Tao & Kelly, 1996), war die

Lokalisation von Ano4 in Wildtyp-Mäusen in der basolateralen Membran des RPE für die Hypothesenbildung wegweisend. Unter Steady-State Bedingungen (d.h. unter einer stabilen Beleuchtung der Netzhaut) überwiegt die Wiederaufnahme von K^+ über apikale Kanäle, wohingegen nach Gq/11-Protein Stimulation K^+ größtenteils basolateral einströmt (Wimmers et al., 2007). Dieser Regulationsmechanismus könnte den Wassertransport durch das RPE fördern, insbesondere nach purinenger Stimulation. So konnten sowohl Ano2 als Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanal als auch Ano4 als Ca^{2+} -abhängiger Kationenkanal durch Gabe von ATP aktiviert werden.

Ca_v1.3:

Das Elektrokulogramm (EOG) ist ein lichtbasierter Test, der Informationen über den Metabolismus der äußeren Netzhaut, im Wesentlichen des RPE, liefert. Der Test basiert darauf, dass das Auge elektrophysiologisch einen Dipol darstellt, der auf der retinalen Seite negativ gegenüber der kornealen Seite geladen ist. Unter Lichteinfluss verstärkt sich dieser Dipol. Als klinisch relevante Größe wird die Amplitude des Maximums des Lichtanstieges (Light-Peak) gemessen. (Constable et al., 2017). Der Light Peak (LP) im EOG (ca.7-12min nach Beginn der Hellphase) basiert auf der Depolarisation der basolateralen Membran des RPE aufgrund eines Anstieges der Cl^- -Leitfähigkeit (Gallemore & Steinberg, 1989; Linsenmeier & Steinberg, 1983; Steinberg, 1985) und somit einen Anstieg im Cl^- -Transport durch das RPE in Richtung Chorioidea. Hinweise darauf, dass der LP von der Präsenz von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen abhängig ist, lieferten Daten von transgenen Mausmodellen. So wiesen Mäuse denen die porenbildende Untereinheit Ca_v1.3 fehlt (J. Wu et al., 2007), sowie Mäuse bei denen die auxiliäre $\beta 4$ -Einheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals funktionslos ist (L. Y. Marmorstein et al., 2006), einen verminderten LP auf. Systemische Gabe des Ca^{2+} -Kanalantagonisten Nifedipin führte bei normalen Probanden ebenfalls zur Verminderung des LP (Constable, 2011). Eine genaue Charakterisierung der Mechanismen, wie die Ca_v1.3 Aktivität mit dem Cl^- -Transport zusammenhängt, fehlt noch. Es ist jedoch vorstellbar, dass über die Regulation des Ca_v1.3 zum Beispiel über Rab27a neben einer Verminderung der Sekretion auch der LP kleiner wird, und es somit zu einer Verminderung des Cl^- -Transports kommt.

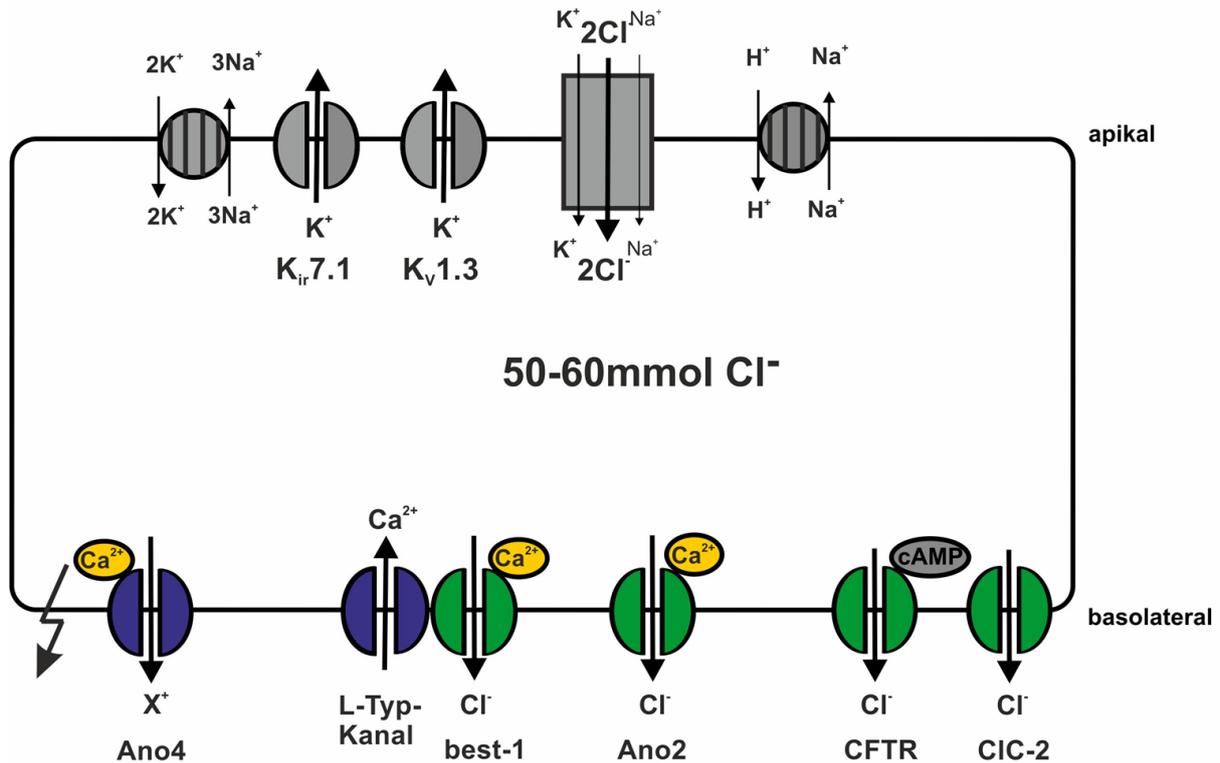


Abbildung 3: Determinanten der basolateralen Cl⁻-Leitfähigkeit im RPE (angepasst (Reichhart & Strauss, 2014)) In dieser Habilitationsschrift wurde CFTR und CIC-2 nicht näher beleuchtet und sind nur der Vollständigkeit halber enthalten. Als Ca²⁺-abhängige Kanäle sind Bestrophin-1 (best-1) und Anx2 als CaCC dargestellt und Anx4 als Ca²⁺-abhängiger Kationenkanal. Spannungsabhängige L-Typ Ca²⁺-Kanäle sorgen für einen Anstieg des Ca²⁺ in der Zelle.

3.1.3.2 Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente

Die Phagozytose der Außensegmente der Photorezeptoren ist eine der Kardinalfunktionen des RPE zur Aufrechterhaltung der Sehkraft. Die Phagozytose und Erneuerung der Außensegmente ist ein präzise abgestimmter Prozess, der einem zirkadianen Rhythmus folgt, welcher durch Helligkeits- und Dunkelheitsphasen getriggert wird. Hierbei setzt die Phagozytose am Morgen ein und persistiert über eine Zeit von etwa 90 min (LaVail, 1976). Dieser Rhythmus zeigt sich auch unter konstanter Beleuchtung, jedoch benötigt er Licht als zeitlichen Trigger zur Harmonisierung

mit dem Tageszyklus (LaVail, 1980). Neuere Studien lassen vermuten, dass diese zirkadiane Regulation ionalen Mechanismen unterliegt (Müller et al., 2014).

Bislang konnten verschiedene Rezeptoren auf dem RPE identifiziert werden, die in den Prozess der Phagozytose involviert sind (Mazzoni et al., 2014). Nach Bindung der Photorezeptoraußensegmente an den Oberflächenrezeptor MER Proto-Oncogene Tyrosine Kinase (MERTK) kommt es zu einem intrazellulären Anstieg des IP3 als Second-Messenger, was auch einen Anstieg des freien zytosolischen Ca^{2+} bedingen sollte, und damit den Aktivierungsmechanismus der Phagozytose darstellt (Heth & Marescalchi, 1994; Heth & Schmidt, 1991). Der MERTK-Ligand Growth Arrest-Specific 6 (Gas6) erhöht die Phagozytoserate *in vitro* in kultivierten Rattenzellen, allerdings benötigt dieser Prozess Ca^{2+} (Hall et al., 2001; Karl et al., 2008).

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im RPE ist die Stellschraube der Phagozytoseaktivität und Mechanismen, die die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen, modulieren auch die Phagozytoserate. Relevante Kandidaten für die Beteiligung von Ionenkanälen an der Regulation der Phagozytose sind der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, TRPV-Kanäle, Bestrophin-1 und BK-Kanäle (Karl et al., 2008; Müller et al., 2014). Während *in vitro* Daten lediglich die Empfindlichkeit der Phagozytose-Aktivität gegenüber der Hemmung/Aktivierung von Ionenkanäle aufzeigen konnten, so können die Daten aus KO-Mausmodellen die funktionelle Bedeutung genauer beleuchten. In Mäusen, die keinen $Ca_v1.3$ exprimieren oder in solchen die keinen BK-Kanal exprimieren, kommt es zu einer Zeitverschiebung des Aktivitätspeaks der Phagozytose am Morgen und zu einer entsprechend veränderten Phagozytose-Grundaktivität am Nachmittag.

Hierbei scheint der Effekt der TRPV-Kanäle und des Bestrophin-1 über eine Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase und daraus resultierender Modulation der Phagozytoserate zu liegen; Applikation eines TRPV-Antagonisten führte zu einer Verminderung der Phagozytose, Applikation eines Agonisten zu einer entsprechenden Zunahme der Phagozytose (Müller et al., 2014). Auch die Inhibition der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle blockierte die Phagozytoseaktivität *in vitro* (Karl et al., 2008; Müller et al., 2014), Applikation eines Agonisten zeigte hier keinerlei Wirkung. Zusammen mit Daten aus KO-Mausmodellen lässt sich schlussfolgern, dass $Ca_v1.3$ und BK- Kanäle neben der

direkten Modulation der Phagozytoseaktivität primär die Regulation des Phagozytose-Rhythmus bewirken (Müller et al., 2014).

3.2 VEGF-A und das VEGF-Rezeptornetzwerk: Inflammation und Angiogenese

Das VEGF-Signalnetzwerk verfügt über eine große Zahl von Rezeptoren und Agonisten. Diese Komplexität dient sehr unterschiedlichen Funktionen wie Angiogenese, Lymphangiogenese und Immunregulation (Partanen & Paavonen, 2001). Diese Funktionen fügen sich durch das Netzwerk zum Beispiel in eine effiziente Koordination von Wundheilungsprozessen zusammen. Die verschiedenen Rezeptoren rekrutieren spezifisch die benötigten Zielzellen und bedingen deren benötigte Funktionsänderungen. Die Reaktionen des Netzwerkes sind stark kontext-abhängig zwischen Embryonalentwicklung, Regeneration angegriffener Gewebe, Stabilisierung von Geweben und pathologischer Proliferation (Autiero et al., 2003; Carmeliet et al., 2001; Claesson-Welsh, 2016; Dewerchin & Carmeliet, 2012).

Entscheidend für die Koordination von Neoangiogenese und Inflammation sind die Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2, wobei grob abgegrenzt VEGFR1 den funktionellen Schwerpunkt auf der Inflammation und VEGFR2 auf der Förderung der Angiogenese hat (Claesson-Welsh, 2016; Koch et al., 2011). VEGFR1 rekrutiert Immunzellen, wie mononukleäre Makrophagen (Ribatti, 2008; Uemura et al., 2021). VEGFR2 ist ein Förderer der Endothelzellproliferation. Die Koordination von Angiogenese und Inflammation erfolgt indirekt durch zum Beispiel über VEGFR1 und seinen spezifischen Agonisten PGF, das nur im Fall einer Gewebspathologie exprimiert wird, durch Makrophagen, die zur Sekretion von VEGF-A angeregt werden, das wiederum VEGFR2 und Endothelzellen stimuliert. Direkt erfolgt die Koordination durch VEGF-A, das VEGFR1 als auch VEGFR2 aktiviert. Damit würde VEGF-A durch die in den Arbeiten 2.1-2.5 beschriebenen Ergänzungen zum Verständnis des VEGF-A Sekretion regulierenden Ca^{2+} -Signaling essenziell für die pathologischen Prozesse in der äußeren Netzhaut sein, die durch das RPE reguliert werden.

3.2.1 VEGF-A und PGF in der Koordination von Inflammation und Angiogenese im Tiermodell für chorioidale Neovaskularisation

Die Rolle von VEGFR1 und VEGFR2 im Kontext der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration (nAMD oder feuchte AMD) beleuchtet die Arbeit 2.6. Diese Arbeit bedient sich hierzu dem relevanten Mausmodell, der Laser-induzierten Neovaskularisation (Grossniklaus et al., 2010). Um die Rolle der beiden Rezeptoren zu verstehen, hat sich diese Arbeit auf die weniger bekannte Funktion des VEGFR1 fokussiert, damit ein Verständnis zum Verhältnis der beiden Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 möglich wird.

Der spezifische Agonist für den VEGFR1 ist PGF. Neben seiner Rolle während der Schwangerschaft und der Embryonalentwicklung ist PGF vor allem aus dem Bereich der pathologischen Angiogenese bei z.B. bei Tumoren oder Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises oder auch für seine Rolle bei der Wundheilung bekannt (Dewerchin & Carmeliet, 2012). PGF und dessen Rezeptor VEGFR1 bilden eine Brücke zwischen dem vaskulären und dem inflammatorischen Signalsystem, da PGF exklusiv an VEGFR1 bindet. VEGFR1 wird auf der vaskulären Seite von Endothelzellen exprimiert und auf der inflammatorischen Seite wird dieser Rezeptor auf Entzündungszellen, wie zum Beispiel auf MP exprimiert (Huang et al., 2013; Stewart et al., 2011; Uemura et al., 2021). Somit sind diese Zellen durch Anstieg in der PGF-Konzentration beeinflussbar.

Wir konnten im Modell der laserinduzierten CNV zeigen, dass PGF eine wichtige Rolle in der Frühphase der Immunantwort nach Laser spielt (Tag 1-3), welche mit der Aktivierung der Immunzellen einhergeht. Weitere Daten belegen, dass dies durch die direkte Stimulation der MP durch PGF geschieht. So führt eine anti-PGF Therapie im Mausmodell zur Verminderung der absoluten Zahl sowie der Zahl amöboider und VEGFR1 positiver MP um die Lasernarbe. Huang et al berichten über verminderte Leckagen sowohl unter anti-VEGFR1 als auch anti-VEGFR2-Behandlung (Huang et al., 2011) und verminderte Mikroglia/Monozyteninfiltration unter anti-VEGFR1 vor allem in der Frühphase 3 Tage nach Laser (Huang et al., 2013). Da in experimentellen

Studien im Lasermodell (siehe Publikation 2.6 und (Balser et al., 2019) die Wirkung der Kombitherapie aus anti-PGF mit der konventionellen anti-VEGF-A Therapie den jeweiligen Einzeltherapien sowohl bei bezüglich der anti-angiogenen als auch bei der anti-inflammatorischen Wirkung überlegen ist, ist hier ein Synergismus beider Komponenten sichtbar. Obwohl es in den groß angelegten klinischen Vergleichsstudien (Heier et al., 2012; Sarwar et al., 2016; Schmidt-Erfurth et al., 2014; Yuzawa et al., 2015) keine Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber der anti-VEGF-A Monotherapie gab, sprechen eine wachsende Zahl von Fallstudien von Patienten, bei denen sich eine Therapieresistenz ausgebildet hat oder die schon initial nicht auf anti-VEGF-A Monotherapie ansprechen, und dann unter der Kombitherapie eine Visusverbesserung zeigen, für die Relevanz von PGF bei der AMD-Pathogenese zumindest bei einem Teil des Patientenkollektiv (Azuma et al., 2018; Cho et al., 2013; Fassnacht-Riederle et al., 2014; Fujii et al., 2014; Grewal et al., 2014; Ho et al., 2013; Kawashima et al., 2015; Kumar et al., 2013; Messenger et al., 2014; Michalewski et al., 2014; Patel et al., 2013; Pinheiro-Costa et al., 2015; Ricci et al., 2017; Spooner et al., 2017; Unsal & Cubuk, 2018; Wykoff et al., 2014; Yonekawa et al., 2013). Bei diesen Patienten zeigten sich auch erhöhte PGF-Spiegel im Kammerwasser (Pongsachareonnont et al., 2018). Da PGF mit VEGF-A um die Bindung an VEGFR1 konkurriert, kann durch die Kombinationstherapie ggf. die Bindung von VEGF-A an seine beiden Rezeptoren und somit die Wirkung moduliert werden.

Relativierend ist dazu zu sagen, dass es auch Case Reports gibt, in denen ausgewählte Patienten von einem Wechsel von Aflibercept zu Ranibizumab profitieren (Gale et al., 2020; Lee et al., 2021; Marquis & Mantel, 2020; Salabati et al., 2022), so dass es in der Gruppe der Patienten mit neovaskulärer AMD wohl interindividuelle Unterschiede in der Pathogenese und somit im Ansprechen auf die jeweilige Therapie gibt.

Da neben der AMD vielen anderen erworbenen Formen der Retinadegeneration wie z.B. diabetischer oder hypertensiver Retinopathie die Kombination aus vaskulärer und entzündlicher Komponente gemein ist, liegt die Hypothese nahe, dass PGF ggf. auch dort, vor allem in der Frühphase der Erkrankung eine bedeutende bislang unbeachtete pathogenetische Rolle spielt. PGF könnte hier eine Art Regulator der Gewebsreparatur bei akuten und chronischen

Retinaschäden sein, der Pathologien triggert, wenn die jeweiligen Noxen zu stark bzw. zu lange einwirken.

Somit hätte eine anti-PGF Therapie erhebliches Potential, die Behandlung von Retinadegenerationen zu verbessern, da bislang nur symptomatisch die Neovaskularisationen mit anti-VEGF-A behandelt werden können und eine kausal orientierte Therapie noch nicht existiert.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Ca^{2+} fungiert als elementares Signalmolekül der Zelle (Berridge 1993, Clapham 1995). Der zeitliche und räumliche Verlauf eines Ca^{2+} -Signals bestimmt seine Wirkung auf die Zellfunktion. Wesentliche, durch Ca^{2+} gesteuerte Funktionen des RPE sind Ionentransport, Phagozytose (von Photorezeptoraußensegmenten) und Sekretion.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verständnis der komplexen Vorgänge des Ca^{2+} -Signaling im RPE wesentlich verbessert. Die Modulation von 2 Ionenkanälen, die den Ca^{2+} -Spiegel in RPE Zellen erhöhen, TRPV2 und $\text{Cav}1.3$, wurde beleuchtet. Hier kam es zu erhöhter Membranoberflächenexpression (TRPV2) sowie Veränderungen wesentlicher elektrophysiologischer Parameter wie Stromdichte und Aktivierungspotential (TRPV2, $\text{Cav}1.3$).

Zudem wurden mit Ano2 und Ano4 molekulare Korrelate für den Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanal bzw. Ca^{2+} -abhängigen Kationenkanal in der basolateralen Membran des RPE identifiziert.

Als Ca^{2+} -abhängige Mechanismen wurde neben dem Ionentransport ein Fokus auf die Sekretion von pro-angiogenen und pro-inflammatorischen Komponenten VEGF-A und PGF gelegt.

Somit konnte eine Brücke geschlagen werden von der Analyse zellphysiologischer Mechanismen zu Pathomechanismen bei verschiedenen retinalen Erkrankungen mit inflammatorischer und angiogener Komponente wie zum Beispiel diabetischer Retinopathie (DR) und Altersabhängiger Makuladegeneration (AMD).

Das RPE fungiert hier als educational barrier: bei Inflammation kommt es nicht zum Versagen der Barriere, sondern vielmehr zu einer orchestrierten Reaktion, bestehend aus ionalen und zellulären Mechanismen. Autokrine und endokrine Sekretion von proinflammatorischen und pro-angiogenen Faktoren spielt hier ebenso eine Rolle wie die Interaktion mit zellulären Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Hieraus leitet sich die Notwendigkeit ab zukünftige Therapiestrategien für DR und AMD nicht primär auf die Effektoren wie Endothelzellen oder Entzündungszellen zu konzentrieren, sondern die pathophysiologischen Prozesse im Zentrum, dem RPE zu adressieren/modulieren.

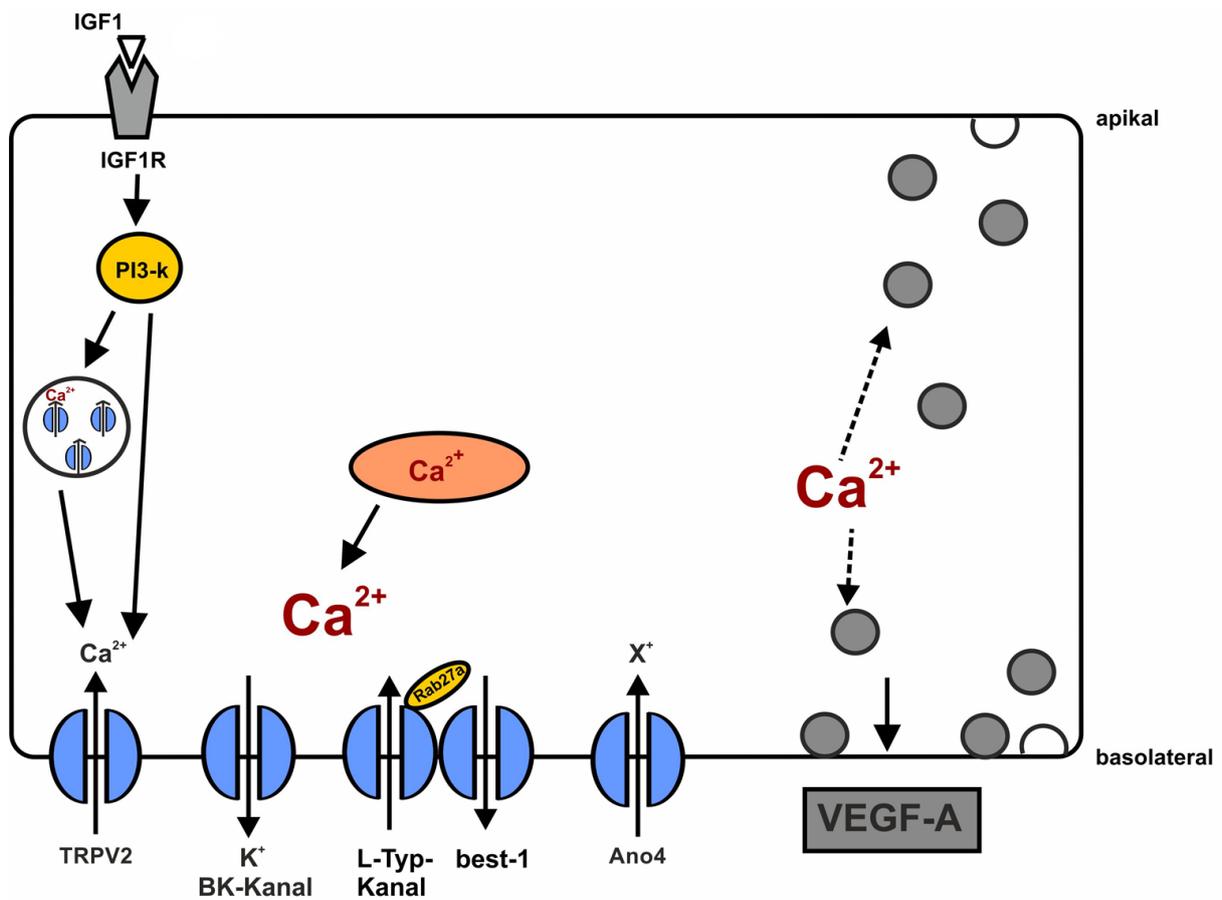


Abbildung 4: Mechanismen der Ca²⁺-Erhöhung im RPE, welche die Sekretion verschiedener Faktoren, so zum Beispiel VEGF-A triggern. Die intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung mittels der Entleerung intrazellulärer Ca²⁺ Speicher ist nicht Gegenstand dieser Habilitationsschrift (angepasst (Reichhart & Strauss, 2014))

5 REFERENZEN

- Abràmoff, M. D., Garvin, M. K., & Sonka, M. (2010). Retinal imaging and image analysis. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 3, 169–208. <https://doi.org/10.1109/RBME.2010.2084567>
- Agrahari, A. K., Doss, G. P. C., Siva, R., Magesh, R., & Zayed, H. (2019). Molecular insights of the G2019S substitution in LRRK2 kinase domain associated with Parkinson's disease: A molecular dynamics simulation approach. *Journal of Theoretical Biology*, 469, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.03.003>
- Agrahari, A. K., Krishna Priya, M., Praveen Kumar, M., Tayubi, I. A., Siva, R., Prabhu Christopher, B., George Priya Doss, C., & Zayed, H. (2019). Understanding the structure-function relationship of HPRT1 missense mutations in association with Lesch-Nyhan disease and HPRT1-related gout by in silico mutational analysis. *Computers in Biology and Medicine*, 107, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2019.02.014>
- Agrahari, A. K., Kumar, A., R, S., Zayed, H., & C, G. P. D. (2018). Substitution impact of highly conserved arginine residue at position 75 in GJB1 gene in association with X-linked Charcot-Marie-tooth disease: A computational study. *Journal of Theoretical Biology*, 437, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.10.028>
- Agrahari, A. K., Pieroni, E., Gatto, G., & Kumar, A. (2019). The impact of missense mutation in PIGA associated to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 2: A computational study. *Heliyon*, 5(10), e02709. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02709>
- Alm, A., & Bill, A. (1970). Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures. *Acta Physiologica Scandinavica*, 80(1), 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1970.tb04765.x>
- Alm, A., & Bill, A. (1973). Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Experimental Eye Research*, 15(1), 15–29. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(73\)90185-1](https://doi.org/10.1016/0014-4835(73)90185-1)
- Anantharam, A., & Kreutzberger, A. J. B. (2019). Unraveling the mechanisms of calcium-dependent secretion. *The Journal of General Physiology*, 151(4), 417–434. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812298>

- AthanasIU, L., Mattingsdal, M., Kähler, A. K., Brown, A., Gustafsson, O., Agartz, I., Giegling, I., Muglia, P., Cichon, S., Rietschel, M., Pietiläinen, O. P. H., Peltonen, L., Bramon, E., Collier, D., Clair, D. S., Sigurdsson, E., Petursson, H., Rujescu, D., Melle, I., ... Andreassen, O. A. (2010). Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort. *Journal of Psychiatric Research*, *44*(12), 748–753.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.02.002>
- Autiero, M., Lutun, A., Tjwa, M., & Carmeliet, P. (2003). Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *1*(7), 1356–1370. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00263.x>
- Azuma, K., Asaoka, R., Matsuda, A., Lee, J., Shimizu, K., Inui, H., Murata, H., Ogawa, A., Yamamoto, M., Inoue, T., & Obata, R. (2018). Two-year outcome of treat-and-extend aflibercept after ranibizumab in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy patients. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, *12*, 1589–1597.
<https://doi.org/10.2147/OPHTH.S172115>
- Bahadoran, P., Aberdam, E., Mantoux, F., Buscà, R., Bille, K., Yalman, N., de Saint-Basile, G., Casaroli-Marano, R., Ortonne, J. P., & Ballotti, R. (2001). Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. *The Journal of Cell Biology*, *152*(4), 843–850.
<https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.843>
- Balser, C., Wolf, A., Herb, M., & Langmann, T. (2019). Co-inhibition of PGF and VEGF blocks their expression in mononuclear phagocytes and limits neovascularization and leakage in the murine retina. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1419-2>
- Barro-Soria, R., Stindl, J., Müller, C., Foeckler, R., Todorov, V., Castrop, H., & Strauß, O. (2012). Angiotensin-2-mediated Ca²⁺ signaling in the retinal pigment epithelium: role of angiotensin-receptor-associated-protein and TRPV2 channel. *PLoS One*, *7*(11), e49624.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049624>
- Beatty, S., Boulton, M., Henson, D., Koh, H. H., & Murray, I. J. (1999). Macular pigment and age related macular degeneration. *The British Journal of Ophthalmology*, *83*(7), 867–877.
<https://doi.org/10.1136/bjo.83.7.867>
- Benarroch, E. E. (2017). Anoctamins (TMEM16 proteins): Functions and involvement in neurologic disease. *Neurology*, *89*(7), 722–729.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004246>

- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21.
<https://doi.org/10.1038/35036035>
- Best, J. M., Foell, J. D., Buss, C. R., Delisle, B. P., Balijepalli, R. C., January, C. T., & Kamp, T. J. (2011). Small GTPase Rab11b regulates degradation of surface membrane L-type Cav1.2 channels. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300(5), C1023–33.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00288.2010>
- Blaauwgeers, H. G., Holtkamp, G. M., Rutten, H., Witmer, A. N., Koolwijk, P., Partanen, T. A., Alitalo, K., Kroon, M. E., Kijlstra, A., van Hinsbergh, V. W., & Schlingemann, R. O. (1999). Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *The American Journal of Pathology*, 155(2), 421–428.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65138-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65138-3)
- Blaug, S., Quinn, R., Quong, J., Jalickee, S., & Miller, S. S. (2003). Retinal pigment epithelial function: a role for CFTR? *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 106(1), 43–50. <https://doi.org/10.1023/a:1022514031645>
- Bösl, M. R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F., & Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel disruption. *The EMBO Journal*, 20(6), 1289–1299. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1289>
- Botchkin, L. M., & Matthews, G. (1993). Chloride current activated by swelling in retinal pigment epithelium cells. *The American Journal of Physiology*, 265(4 Pt 1), C1037–45.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.4.C1037>
- Boulton, M., & Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (London, England)*, 15(Pt 3), 384–389.
<https://doi.org/10.1038/eye.2001.141>
- Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological Reviews*, 83(2), 581–632. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2002>
- Cai, J., Qi, X., Kociok, N., Skosyrski, S., Emilio, A., Ruan, Q., Han, S., Liu, L., Chen, Z., Bowes Rickman, C., Golde, T., Grant, M. B., Saftig, P., Serneels, L., de Strooper, B., Jousen, A. M., & Boulton, M. E. (2012). β -Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregulation and accumulation of age pigment. *EMBO Molecular Medicine*, 4(9), 980–991.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201101084>

- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., Scholz, D., Acker, T., DiPalma, T., Dewerchin, M., Noel, A., Stalmans, I., Barra, A., Blacher, S., VandenDriessche, T., ... Persico, M. G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*, *7*(5), 575–583. <https://doi.org/10.1038/87904>
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., & Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, *398*(6726), 436–441. <https://doi.org/10.1038/18906>
- Chien, L.-T., Zhang, Z.-R., & Hartzell, H. C. (2006). Single Cl⁻ channels activated by Ca²⁺ in Drosophila S2 cells are mediated by bestrophins. *The Journal of General Physiology*, *128*(3), 247–259. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609581>
- Cho, H., Shah, C. P., Weber, M., & Heier, J. S. (2013). Aflibercept for exudative AMD with persistent fluid on ranibizumab and/or bevacizumab. *The British Journal of Ophthalmology*, *97*(8), 1032–1035. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-303344>
- Claesson-Welsh, L. (2016). VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascular Pharmacology*, *86*, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.011>
- Constable, P. A. (2011). Nifedipine alters the light-rise of the electro-oculogram in man. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *249*(5), 677–684. <https://doi.org/10.1007/s00417-010-1604-6>
- Constable, P. A., Bach, M., Frishman, L. J., Jeffrey, B. G., & Robson, A. G. (2017). ISCEV Standard for clinical electro-oculography (2017 update). *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, *134*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10633-017-9573-2>
- Cooper, A. (1979). Energy uptake in the first step of visual excitation. *Nature*, *282*(5738), 531–533. <https://doi.org/10.1038/282531a0>
- Copland, D. A., Theodoropoulou, S., Liu, J., & Dick, A. D. (2018). A Perspective of AMD Through the Eyes of Immunology. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *59*(4), AMD83–AMD92. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-23893>
- Cordeiro, S., Seyler, S., Stindl, J., Milenkovic, V. M., & Strauss, O. (2010). Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *51*(11), 6001–6008. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4720>

- Delori, F. C., Goger, D. G., & Dorey, C. K. (2001). Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *42*(8), 1855–1866.
- Dewerchin, M., & Carmeliet, P. (2012). PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(8).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011056>
- Dornonville de la Cour, M. (1993). Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. *Acta Ophthalmologica. Supplement*, *209*, 1–32.
- Edelman, J. L., & Miller, S. S. (1991). Epinephrine stimulates fluid absorption across bovine retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *32*(12), 3033–3040.
- El-Amraoui, A., Schonh, J.-S., Küssel-Andermann, P., Blanchard, S., Desnos, C., Henry, J.-P., Wolfrum, U., Darchen, F., & Petit, C. (2002). MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Reports*, *3*(5), 463–470.
<https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf090>
- Fassnacht-Riederle, H., Becker, M., Graf, N., & Michels, S. (2014). Effect of aflibercept in insufficient responders to prior anti-VEGF therapy in neovascular AMD. *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *252*(11), 1705–1709. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2589-3>
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(6), 789–791. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179663>
- Fujii, A., Imai, H., Kanai, M., & Azumi, A. (2014). Effect of intravitreal aflibercept injection for age-related macular degeneration with a retinal pigment epithelial tear refractory to intravitreal ranibizumab injection. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, *8*, 1199–1202.
<https://doi.org/10.2147/OPHTH.S65810>
- Futter, C. E., Ramalho, J. S., Jaissle, G. B., Seeliger, M. W., & Seabra, M. C. (2004). The role of Rab27a in the regulation of melanosome distribution within retinal pigment epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(5), 2264–2275. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0772>
- Gailly, P. (2012). TRP channels in normal and dystrophic skeletal muscle. *Current Opinion in Pharmacology*, *12*(3), 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.01.018>
- Gale, R. P., Pearce, I., Eter, N., Ghanchi, F., Holz, F. G., Schmitz-Valckenberg, S., Balaskas, K., Burton, B. J. L., Downes, S. M., Eleftheriadis, H., George, S., Gilmour, D., Hamilton, R., Lotery, A.

- J., Patel, N., Prakash, P., Santiago, C., Thomas, S., Varma, D., ... Ayan, F. (2020). Anatomical and functional outcomes following switching from aflibercept to ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration in Europe: SAFARI study. *The British Journal of Ophthalmology*, 104(4), 493–499. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-314251>
- Gallemore, R. P., Griff, E. R., & Steinberg, R. H. (1988). Evidence in support of a photoreceptor origin for the “light-peak substance”. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29(4), 566–571.
- Gallemore, R. P., Hughes, B. A., & Miller, S. S. (1997). Retinal pigment epithelial transport mechanisms and their contributions to the electroretinogram. *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(4), 509–566. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(96\)00037-7](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(96)00037-7)
- Gallemore, R. P., & Steinberg, R. H. (1989). Effects of DIDS on the chick retinal pigment epithelium. II. Mechanism of the light peak and other responses originating at the basal membrane. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(6), 1977–1984. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-06-01977.1989>
- Gandini, M. A., Sandoval, A., González-Ramírez, R., Mori, Y., de Waard, M., & Felix, R. (2011). Functional coupling of Rab3-interacting molecule 1 (RIM1) and L-type Ca²⁺ channels in insulin release. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 15757–15765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187757>
- Gebhart, M., Juhasz-Vedres, G., Zuccotti, A., Brandt, N., Engel, J., Trockenbacher, A., Kaur, G., Obermair, G. J., Knipper, M., Koschak, A., & Striessnig, J. (2010). Modulation of Cav1.3 Ca²⁺ channel gating by Rab3 interacting molecule. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 44(3), 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.03.011>
- Gómez, N. M., Tamm, E. R., & Strauß, O. (2013). Role of bestrophin-1 in store-operated calcium entry in retinal pigment epithelium. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 465(4), 481–495. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1181-0>
- Grewal, D. S., Gill, M. K., Sarezky, D., Lyon, A. T., & Mirza, R. G. (2014). Visual and anatomical outcomes following intravitreal aflibercept in eyes with recalcitrant neovascular age-related macular degeneration: 12-month results. *Eye (London, England)*, 28(7), 895–899. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.101>
- Grossniklaus, H. E., Kang, S. J., & Berglin, L. (2010). Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(6), 500–519. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.05.003>

- Guillonneau, X., Eandi, C. M., Paques, M., Sahel, J.-A., Sapieha, P., & Sennlaub, F. (2017). On phagocytes and macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, *61*, 98–128. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.06.002>
- Haddad, E. K., Wu, X., Hammer, J. A. 3rd, & Henkart, P. A. (2001). Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *The Journal of Cell Biology*, *152*(4), 835–842. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.835>
- Hahn, A., Salomon, J. J., Leitz, D., Feigenbutz, D., Korsch, L., Lisewski, I., Schrimpf, K., Millar-Büchner, P., Mall, M. A., Frings, S., & Möhrlein, F. (2018). Expression and function of Anoctamin 1/TMEM16A calcium-activated chloride channels in airways of in vivo mouse models for cystic fibrosis research. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, *470*(9), 1335–1348. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2160-x>
- Hall, M. O., Prieto, A. L., Obin, M. S., Abrams, T. A., Burgess, B. L., Heeb, M. J., & Agnew, B. J. (2001). Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Experimental Eye Research*, *73*(4), 509–520. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1062>
- Hartzell, H. C., & Qu, Z. (2003). Chloride currents in acutely isolated *Xenopus* retinal pigment epithelial cells. *The Journal of Physiology*, *549*(Pt 2), 453–469. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040428>
- Hartzell, H. C., Qu, Z., Yu, K., Xiao, Q., & Chien, L.-T. (2008). Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiological Reviews*, *88*(2), 639–672. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2007>
- Hassan, S., Eldeeb, K., Millns, P. J., Bennett, A. J., Alexander, S. P. H., & Kendall, D. A. (2014). Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *British Journal of Pharmacology*, *171*(9), 2426–2439. <https://doi.org/10.1111/bph.12615>
- Heier, J. S., Brown, D. M., Chong, V., Korobelnik, J.-F., Kaiser, P. K., Nguyen, Q. D., Kirchhof, B., Ho, A., Ogura, Y., Yancopoulos, G. D., Stahl, N., Vitti, R., Berliner, A. J., Soo, Y., Anderesi, M., Groetzbach, G., Sommerauer, B., Sandbrink, R., Simader, C., & Schmidt-Erfurth, U. (2012). Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, *119*(12), 2537–2548. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.09.006>
- Hendrickx, D. A. E., van Scheppingen, J., van der Poel, M., Bossers, K., Schuurman, K. G., van Eden, C. G., Hol, E. M., Hamann, J., & Huitinga, I. (2017). Gene Expression Profiling of Multiple Sclerosis Pathology Identifies Early Patterns of Demyelination Surrounding Chronic Active Lesions. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1810. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01810>

- Heth, C. A., & Marescalchi, P. A. (1994). Inositol triphosphate generation in cultured rat retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *35*(2), 409–416.
- Heth, C. A., & Schmidt, S. Y. (1991). Phagocytic challenge induces changes in phosphorylation of retinal pigment epithelium proteins. *Current Eye Research*, *10*(11), 1049–1057.
<https://doi.org/10.3109/02713689109020343>
- Ho, V. Y., Yeh, S., Olsen, T. W., Bergstrom, C. S., Yan, J., Cribbs, B. E., & Hubbard, G. B. 3rd. (2013). Short-term outcomes of aflibercept for neovascular age-related macular degeneration in eyes previously treated with other vascular endothelial growth factor inhibitors. *American Journal of Ophthalmology*, *156*(1), 23-28.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.02.009>
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., & Wong, R. O. L. (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, *42*, 44–84.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003>
- Hu, J. G., Gallemore, R. P., Bok, D., & Frambach, D. A. (1996). Chloride transport in cultured fetal human retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research*, *62*(4), 443–448.
<https://doi.org/10.1006/exer.1996.0049>
- Huang, H., Parlier, R., Shen, J.-K., Luttly, G. A., & Viores, S. A. (2013). VEGF receptor blockade markedly reduces retinal microglia/macrophage infiltration into laser-induced CNV. *PLoS One*, *8*(8), e71808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071808>
- Huang, H., Shen, J., & Viores, S. A. (2011). Blockade of VEGFR1 and 2 suppresses pathological angiogenesis and vascular leakage in the eye. *PLoS One*, *6*(6), e21411.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021411>
- Hughes, B. A., Takahira, M., & Segawa, Y. (1995). An outwardly rectifying K⁺ current active near resting potential in human retinal pigment epithelial cells. *The American Journal of Physiology*, *269*(1 Pt 1), C179-87. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.1.C179>
- Hume, A. N., Collinson, L. M., Rapak, A., Gomes, A. Q., Hopkins, C. R., & Seabra, M. C. (2001). Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *The Journal of Cell Biology*, *152*(4), 795–808. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.795>
- Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z., & Streilein, J. W. (2003). Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocular Immunology and Inflammation*, *11*(2), 91–105. <https://doi.org/10.1076/ocii.11.2.91.15914>

- Izumi, T., Gomi, H., Kasai, K., Mizutani, S., & Torii, S. (2003). The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. *Cell Structure and Function*, *28*(5), 465–474. <https://doi.org/10.1247/csf.28.465>
- Jang, Y., & Oh, U. (2014). Anoctamin 1 in secretory epithelia. *Cell Calcium*, *55*(6), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.02.006>
- Joseph, D. P., & Miller, S. S. (1991). Apical and basal membrane ion transport mechanisms in bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of Physiology*, *435*, 439–463. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018518>
- Kadomoto, S., Izumi, K., & Mizokami, A. (2021). Macrophage Polarity and Disease Control. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010144>
- Kanzaki, M., Nagasawa, M., Kojima, I., Sato, C., Naruse, K., Sokabe, M., & Iida, H. (1999). Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel. *Science (New York, N.Y.)*, *285*(5429), 882–886. <https://doi.org/10.1126/science.285.5429.882>
- Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., & Kojima, I. (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nature Cell Biology*, *1*(3), 165–170. <https://doi.org/10.1038/11086>
- Karl, M. O., Kroeger, W., Wimmers, S., Milenkovic, V. M., Valtink, M., Engelmann, K., & Strauss, O. (2008). Endogenous Gas6 and Ca²⁺-channel activation modulate phagocytosis by retinal pigment epithelium. *Cellular Signalling*, *20*(6), 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.02.005>
- Karlstad, J., Sun, Y., & Singh, B. B. (2012). Ca(2+) signaling: an outlook on the characterization of Ca(2+) channels and their importance in cellular functions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *740*, 143–157. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_6
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W. T., Provis, J. M., & Langmann, T. (2015). Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research*, *45*, 30–57. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.11.004>
- Kasai, K., Ohara-Imaizumi, M., Takahashi, N., Mizutani, S., Zhao, S., Kikuta, T., Kasai, H., Nagamatsu, S., Gomi, H., & Izumi, T. (2005). Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(2), 388–396. <https://doi.org/10.1172/JCI22955>

- Kaur, C., Foulds, W. S., & Ling, E. A. (2008). Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(6), 622–647. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.09.003>
- Kawashima, Y., Oishi, A., Tsujikawa, A., Yamashiro, K., Miyake, M., Ueda-Arakawa, N., Yoshikawa, M., Takahashi, A., & Yoshimura, N. (2015). Effects of aflibercept for ranibizumab-resistant neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 253(9), 1471–1477. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2838-5>
- Kennedy, B. G., Torabi, A. J., Kurzawa, R., Echtenkamp, S. F., & Mangini, N. J. (2010). Expression of transient receptor potential vanilloid channels TRPV5 and TRPV6 in retinal pigment epithelium. *Molecular Vision*, 16, 665–675.
- Kerr, E. C., Copland, D. A., Dick, A. D., & Nicholson, L. B. (2008). The dynamics of leukocyte infiltration in experimental autoimmune uveoretinitis. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(5), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.07.001>
- Kimura, T., & Niki, I. (2011). Rab27a in pancreatic beta-cells, a busy protein in membrane trafficking. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 107(2), 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2011.06.016>
- Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A. M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K. P., & Mori, Y. (2007). RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nature Neuroscience*, 10(6), 691–701. <https://doi.org/10.1038/nn1904>
- Klettner, A., Kaya, L., Flach, J., Lassen, J., Treumer, F., & Roider, J. (2015). Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growth factor in the RPE/choroid and primary RPE. *Molecular Vision*, 21, 736–748.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical Journal*, 437(2), 169–183. <https://doi.org/10.1042/BJ20110301>
- Kodigepalli, K. M., Bowers, K., Sharp, A., & Nanjundan, M. (2015). Roles and regulation of phospholipid scramblases. *FEBS Letters*, 589(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.036>
- Kumar, N., Marsiglia, M., Mrejen, S., Fung, A. T.-C., Slakter, J., Sorenson, J., & Freund, K. B. (2013). Visual and anatomical outcomes of intravitreal aflibercept in eyes with persistent

subfoveal fluid despite previous treatments with ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 33(8), 1605–1612.

<https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e31828e8551>

Kunzelmann, K., Nilius, B., Owsianik, G., Schreiber, R., Ousingsawat, J., Sirianant, L., Wanitchakool, P., Bevers, E. M., & Heemskerk, J. W. M. (2014). Molecular functions of anoctamin 6 (TMEM16F): a chloride channel, cation channel, or phospholipid scramblase? *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 466(3), 407–414.

<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1305-1>

Kunzelmann, K., Ousingsawat, J., Cabrita, I., Doušová, T., Bähr, A., Janda, M., Schreiber, R., & Benedetto, R. (2019). TMEM16A in Cystic Fibrosis: Activating or Inhibiting? *Frontiers in Pharmacology*, 10, 3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00003>

Kunzelmann, K., Schreiber, R., Kmit, A., Jantarajit, W., Martins, J. R., Faria, D., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., & Tian, Y. (2012). Expression and function of epithelial anoctamins. *Experimental Physiology*, 97(2), 184–192. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.058206>

Lamb, T. D., & Pugh, E. N. J. (2004). Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23(3), 307–380. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.03.001>

Lambooi, A. C., van Wely, K. H. M., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Kuijpers, R. W. A. M., Kliffen, M., & Mooy, C. M. (2003). Insulin-like growth factor-I and its receptor in neovascular age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(5), 2192–2198.

<https://doi.org/10.1167/iovs.02-0410>

LaVail, M. M. (1976). Rod outer segment disc shedding in relation to cyclic lighting. *Experimental Eye Research*, 23(2), 277–280. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(76\)90209-8](https://doi.org/10.1016/0014-4835(76)90209-8)

LaVail, M. M. (1980). Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 19(4), 407–411.

Lee, J. S., Kang, H. G., Lee, C. S., & Woo, S. J. (2021). Short-Term Outcomes following “Switching” to Monthly Ranibizumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Showing Insufficient Response to Bimonthly Aflibercept. *Journal of Ophthalmology*, 2021, 5547686.

<https://doi.org/10.1155/2021/5547686>

Leipzig, J. (2003). Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 284(3), F419–32. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00075.2002>

- Linsenmeier, R. A., & Steinberg, R. H. (1983). A light-evoked interaction of apical and basal membranes of retinal pigment epithelium: c-wave and light peak. *Journal of Neurophysiology*, 50(1), 136–147. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.50.1.136>
- Locati, M., Curtale, G., & Mantovani, A. (2020). Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology*, 15, 123–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>
- Luger, D., Silver, P. B., Tang, J., Cua, D., Chen, Z., Iwakura, Y., Bowman, E. P., Sgambellone, N. M., Chan, C.-C., & Caspi, R. R. (2008). Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(4), 799–810. <https://doi.org/10.1084/jem.20071258>
- Luna, J. D., Chan, C. C., Derevjani, N. L., Mahlow, J., Chiu, C., Peng, B., Tobe, T., Campochiaro, P. A., & Viores, S. A. (1997). Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *Journal of Neuroscience Research*, 49(3), 268–280. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4547\(19970801\)49:3<268::aid-jnr2>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4547(19970801)49:3<268::aid-jnr2>3.0.co;2-a)
- Maniero, C., Scudieri, P., Haris Shaikh, L., Zhao, W., Gurnell, M., Galiotta, L. J. V., & Brown, M. J. (2019). ANO4 (Anoctamin 4) Is a Novel Marker of Zona Glomerulosa That Regulates Stimulated Aldosterone Secretion. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 74(5), 1152–1159. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13287>
- Maniero, C., Zhou, J., Shaikh, L. H., Azizan, E. A. B., McFarlane, I., Neogi, S., Scudieri, P., Galiotta, L. J., & Brown, M. J. (2015). Role of ANO4 in regulation of aldosterone secretion in the zona glomerulosa of the human adrenal gland. *Lancet (London, England)*, 385 Suppl, S62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60377-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60377-4)
- Marmorstein, A. D. (2001). The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(12), 867–872. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.21202.x>
- Marmorstein, L. Y., Wu, J., McLaughlin, P., Yocom, J., Karl, M. O., Neussert, R., Wimmers, S., Stanton, J. B., Gregg, R. G., Strauss, O., Peachey, N. S., & Marmorstein, A. D. (2006). The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1). *The Journal of General Physiology*, 127(5), 577–589. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509473>
- Marquis, L.-M., & Mantel, I. (2020). Beneficial switch from aflibercept to ranibizumab for the treatment of refractory neovascular age-related macular degeneration. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und*

Experimentelle Ophthalmologie, 258(8), 1591–1596. <https://doi.org/10.1007/s00417-020-04730-8>

Martins, J. R., Faria, D., Kongsuphol, P., Reisch, B., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2011). Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 18168–18172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108094108>

Mazzoni, F., Safa, H., & Finnemann, S. C. (2014). Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Experimental Eye Research*, 126, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.010>

Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., & de Saint Basile, G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature Genetics*, 25(2), 173–176. <https://doi.org/10.1038/76024>

Messenger, W. B., Campbell, J. P., Faridi, A., Shippey, L., Bailey, S. T., Lauer, A. K., Flaxel, C. J., & Hwang, T. S. (2014). Injection frequency and anatomic outcomes 1 year following conversion to aflibercept in patients with neovascular age-related macular degeneration. *The British Journal of Ophthalmology*, 98(9), 1205–1207. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-304829>

Michalewski, J., Nawrocki, J., Trębińska, M., & Michalewska, Z. (2014). Switch to a single dose of aflibercept in bevacizumab nonresponders with AMD. *Canadian Journal of Ophthalmology. Journal Canadien d'ophtalmologie*, 49(5), 431–435. <https://doi.org/10.1016/j.jcjo.2014.07.012>

Miller, S. S., & Edelman, J. L. (1990). Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of Physiology*, 424, 283–300. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018067>

Miller, S. S., & Steinberg, R. H. (1977). Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *The Journal of Membrane Biology*, 36(4), 337–372. <https://doi.org/10.1007/BF01868158>

Millington-Burgess, S. L., & Harper, M. T. (2020). Gene of the issue: ANO6 and Scott Syndrome. *Platelets*, 31(7), 964–967. <https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1693039>

Mitchell, C. H., & Reigada, D. (2008). Purinergic signalling in the subretinal space: a role in the communication between the retina and the RPE. *Purinergic Signalling*, 4(2), 101–107. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9054-2>

- Moriarty, P., Boulton, M., Dickson, A., & McLeod, D. (1994). Production of IGF-I and IGF binding proteins by retinal cells in vitro. *The British Journal of Ophthalmology*, *78*(8), 638–642. <https://doi.org/10.1136/bjo.78.8.638>
- Müller, C., Más Gómez, N., Ruth, P., & Strauss, O. (2014). CaV1.3 L-type channels, maxiK Ca(2+)-dependent K(+) channels and bestrophin-1 regulate rhythmic photoreceptor outer segment phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *Cellular Signalling*, *26*(5), 968–978. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.021>
- Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M., & Imaizumi, Y. (2003). TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circulation Research*, *93*(9), 829–838. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000097263.10220.0C>
- Nabissi, M., Morelli, M. B., Santoni, M., & Santoni, G. (2013). Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis*, *34*(1), 48–57. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs328>
- Oakley, B. 2nd. (1977). Potassium and the photoreceptor-dependent pigment epithelial hyperpolarization. *The Journal of General Physiology*, *70*(4), 405–425. <https://doi.org/10.1085/jgp.70.4.405>
- Parish, C. A., Hashimoto, M., Nakanishi, K., Dillon, J., & Sparrow, J. (1998). Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(25), 14609–14613. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14609>
- Partanen, T. A., & Paavonen, K. (2001). Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microscopy Research and Technique*, *55*(2), 108–121. <https://doi.org/10.1002/jemt.1162>
- Parver, L. M. (1991). Temperature modulating action of choroidal blood flow. *Eye (London, England)*, *5* (Pt 2), 181–185. <https://doi.org/10.1038/eye.1991.32>
- Patel, K. H., Chow, C. C., Rathod, R., Mieler, W. F., Lim, J. I., Ulanski, L. J. 2nd, Leiderman, Y. I., Arun, V., & Chau, F. Y. (2013). Rapid response of retinal pigment epithelial detachments to intravitreal aflibercept in neovascular age-related macular degeneration refractory to bevacizumab and ranibizumab. *Eye (London, England)*, *27*(5), 663–667; quiz 668. <https://doi.org/10.1038/eye.2013.31>
- Paulino, C., Neldner, Y., Lam, A. K., Kalienkova, V., Brunner, J. D., Schenck, S., & Dutzler, R. (2017). Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A. *ELife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.26232>

- Pedemonte, N., & Galiotta, L. J. V. (2014). Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiological Reviews*, *94*(2), 419–459. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2011>
- Peterson, W. M., Meggyesy, C., Yu, K., & Miller, S. S. (1997). Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(7), 2324–2337. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02324.1997>
- Piccolo, A., Malvezzi, M., & Accardi, A. (2015). TMEM16 proteins: unknown structure and confusing functions. *Journal of Molecular Biology*, *427*(1), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.028>
- Pifferi, S., Cenedese, V., & Menini, A. (2012). Anoctamin 2/TMEM16B: a calcium-activated chloride channel in olfactory transduction. *Experimental Physiology*, *97*(2), 193–199. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.058230>
- Pineiro-Costa, J., Costa, J. M., Beato, J. N., Freitas-da-Costa, P., Brandão, E., Falcão, M. S., Falcão-Reis, F., & Carneiro, Â. M. (2015). Switch to Aflibercept in the Treatment of Neovascular AMD: One-Year Results in Clinical Practice. *Ophthalmologica. Journal International d'ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Fur Augenheilkunde*, *233*(3–4), 155–161. <https://doi.org/10.1159/000381221>
- Pinto, L. H., & Klumpp, D. J. (1998). Localization of potassium channels in the retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, *17*(2), 207–230. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(97\)00011-6](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(97)00011-6)
- Plantner, J. J., Jiang, C., & Smine, A. (1998). Increase in interphotoreceptor matrix gelatinase A (MMP-2) associated with age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, *67*(6), 637–645. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0552>
- Pongsachareonnont, P., Mak, M. Y. K., Hurst, C. P., & Lam, W.-C. (2018). Neovascular age-related macular degeneration: intraocular inflammatory cytokines in the poor responder to ranibizumab treatment. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, *12*, 1877–1885. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S171636>
- Qin, N., Nepper, M. P., Liu, Y., Hutchinson, T. L., Lubin, M. Lou, & Flores, C. M. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(24), 6231–6238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008>
- Querques, G., Forte, R., & Souied, E. H. (2011). Retina and omega-3. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2011*, 748361. <https://doi.org/10.1155/2011/748361>

- Rakic, J.-M., Lambert, V., Devy, L., Luttun, A., Carmeliet, P., Claes, C., Nguyen, L., Foidart, J.-M., Noël, A., & Munaut, C. (2003). Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *44*(7), 3186–3193. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-1092>
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2013). New functions of Müller cells. *Glia*, *61*(5), 651–678. <https://doi.org/10.1002/glia.22477>
- Reichhart, N., Markowski, M., Ishiyama, S., Wagner, A., Crespo-Garcia, S., Schorb, T., Ramalho, J. S., Milenkovic, V. M., Föckler, R., Seabra, M. C., & Strauß, O. (2015). Rab27a GTPase modulates L-type Ca²⁺ channel function via interaction with the II-III linker of CaV1.3 subunit. *Cellular Signalling*, *27*(11), 2231–2240. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.07.023>
- Reichhart, N., Schöberl, S., Keckeis, S., Alfaar, A. S., Roubéix, C., Cordes, M., Crespo-Garcia, S., Haeckel, A., Kociok, N., Föckler, R., Fels, G., Mataruga, A., Rauh, R., Milenkovic, V. M., Zühlke, K., Klussmann, E., Schellenberger, E., & Strauß, O. (2019). Anoctamin-4 is a bona fide Ca²⁺-dependent non-selective cation channel. *Scientific Reports*, *9*(1), 2257. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37287-y>
- Reichhart, N., & Strauss, O. (2014). Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research*, *126*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.05.005>
- Ribatti, D. (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*, *11*(3), 215–221. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9114-4>
- Ricci, F., Parravano, M., Regine, F., Sciamanna, M., Tedeschi, M., Missiroli, F., & Varano, M. (2017). Aflibercept in persistent neovascular AMD: comparison of different treatment strategies in switching therapy. *Eye (London, England)*, *31*(1), 163–164. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.215>
- Rosenthal, R., Heimann, H., Agostini, H., Martin, G., Hansen, L. L., & Strauss, O. (2007). Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Molecular Vision*, *13*, 443–456.
- Rosenthal, R., Malek, G., Salomon, N., Peill-Meininghaus, M., Coeppicus, L., Wohlleben, H., Wimmers, S., Bowes Rickman, C., & Strauss, O. (2005). The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *337*(1), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.028>
- Rosenthal, R., Wohlleben, H., Malek, G., Schlichting, L., Thieme, H., Bowes Rickman, C., & Strauss, O. (2004). Insulin-like growth factor-1 contributes to neovascularization in age-related

macular degeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(4), 1203–1208. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.219>

Rottgen, T. S., Nickerson, A. J., & Rajendran, V. M. (2018). Calcium-Activated Cl(-) Channel: Insights on the Molecular Identity in Epithelial Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051432>

Ryan, J. S., Baldrige, W. H., & Kelly, M. E. (1999). Purinergic regulation of cation conductances and intracellular Ca²⁺ in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *The Journal of Physiology*, 520 Pt 3(Pt 3), 745–759. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00745.x>

Salabati, M., Obeid, A., Mahmoudzadeh, R., Gupta, O., Chiang, A., Spirn, M., Klufas, M. A., & Hsu, J. (2022). Outcomes after switching eyes that were stable on aflibercept to ranibizumab versus continuing aflibercept in neovascular age-related macular degeneration. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*. <https://doi.org/10.1007/s00417-022-05601-0>

Sarwar, S., Clearfield, E., Soliman, M. K., Sadiq, M. A., Baldwin, A. J., Hanout, M., Agarwal, A., Sepah, Y. J., Do, D. V., & Nguyen, Q. D. (2016). Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2(2), CD011346. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011346.pub2>

Schmidt-Erfurth, U., Kaiser, P. K., Korobelnik, J.-F., Brown, D. M., Chong, V., Nguyen, Q. D., Ho, A. C., Ogura, Y., Simader, C., Jaffe, G. J., Slakter, J. S., Yancopoulos, G. D., Stahl, N., Vitti, R., Berliner, A. J., Soo, Y., Anderesi, M., Sowade, O., Zeitz, O., ... Heier, J. S. (2014). Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology*, 121(1), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.08.011>

Schreiber, R., Uliyakina, I., Kongsuphol, P., Warth, R., Mirza, M., Martins, J. R., & Kunzelmann, K. (2010). Expression and function of epithelial anoctamins. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7838–7845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065367>

Seabra, M. C., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1993). Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5093), 377–381. <https://doi.org/10.1126/science.8380507>

Seabra, M. C., Ho, Y. K., & Anant, J. S. (1995). Deficient geranylgeranylation of Ram/Rab27 in choroideremia. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(41), 24420–24427. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.41.24420>

- Shechter, R., London, A., & Schwartz, M. (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. In *Nature reviews. Immunology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 206–218). <https://doi.org/10.1038/nri3391>
- Sherva, R., Gross, A., Mukherjee, S., Koesterer, R., Amouyel, P., Bellenguez, C., Dufouil, C., Bennett, D. A., Chibnik, L., Cruchaga, C., Del-Aguila, J., Farrer, L. A., Mayeux, R., Munsie, L., Winslow, A., Newhouse, S., Saykin, A. J., Kauwe, J. S. K., Crane, P. K., & Green, R. C. (2020). Genome-wide association study of rate of cognitive decline in Alzheimer's disease patients identifies novel genes and pathways. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 16(8), 1134–1145. <https://doi.org/10.1002/alz.12106>
- Sheu, S.-J., & Wu, S.-N. (2003). Mechanism of inhibitory actions of oxidizing agents on calcium-activated potassium current in cultured pigment epithelial cells of the human retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(3), 1237–1244. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0330>
- Sheu, S.-J., Wu, S.-N., Hu, D.-N., & Chen, J.-F. (2004). The influence of hypotonicity on large-conductance calcium-activated potassium channels in human retinal pigment epithelial cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics : The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 20(6), 563–575. <https://doi.org/10.1089/jop.2004.20.563>
- Spooner, K., Hong, T., Wijeyakumar, W., & Chang, A. A. (2017). Switching to aflibercept among patients with treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration: a systematic review with meta-analysis. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 11, 161–177. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S125676>
- Steen, B., Sejersen, S., Berglin, L., Seregard, S., & Kvanta, A. (1998). Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(11), 2194–2200.
- Steinberg, R. H. (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 60(4), 327–346. <https://doi.org/10.1007/BF00158922>
- Steinberg, R. H., Linsenmeier, R. A., & Griff, E. R. (1983). Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Research*, 23(11), 1315–1323. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(83\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0042-6989(83)90107-4)
- Stewart, E. A., Samaranyake, G. J., Browning, A. C., Hopkinson, A., & Amoaku, W. M. (2011). Comparison of choroidal and retinal endothelial cells: characteristics and response to VEGF

isoforms and anti-VEGF treatments. *Experimental Eye Research*, 93(5), 761–766.

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.09.010>

Stinchcombe, J. C., Barral, D. C., Mules, E. H., Booth, S., Hume, A. N., Machesky, L. M., Seabra, M. C., & Griffiths, G. M. (2001). Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, 152(4), 825–834.

<https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.825>

Stöhr, H., Heisig, J. B., Benz, P. M., Schöberl, S., Milenkovic, V. M., Strauss, O., Aartsen, W. M., Wijnholds, J., Weber, B. H. F., & Schulz, H. L. (2009). TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(21), 6809–6818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5546-08.2009>

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85(3), 845–881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>

Strauss, O., Buss, F., Rosenthal, R., Fischer, D., Mergler, S., Stumpff, F., & Thieme, H. (2000). Activation of neuroendocrine L-type channels (alpha1D subunits) in retinal pigment epithelial cells and brain neurons by pp60(c-src). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(3), 806–810. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2513>

Strauß, O., Müller, C., Reichhart, N., Tamm, E. R., & Gomez, N. M. (2014). The role of bestrophin-1 in intracellular Ca(2+) signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 801, 113–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8_15

Strauss, O., Rosenthal, R., Dey, D., Beninde, J., Wollmann, G., Thieme, H., & Wiederholt, M. (2002). Effects of protein kinase C on delayed rectifier K+ channel regulation by tyrosine kinase in rat retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(5), 1645–1654.

Strauss, O., Steinhausen, K., Mergler, S., Stumpff, F., & Wiederholt, M. (1999). Involvement of protein tyrosine kinase in the InsP3-induced activation of Ca2+-dependent Cl- currents in cultured cells of the rat retinal pigment epithelium. *The Journal of Membrane Biology*, 169(3), 141–153. <https://doi.org/10.1007/s002329900526>

Strauss, O., Wiederholt, M., & Wienrich, M. (1996). Activation of Cl- currents in cultured rat retinal pigment epithelial cells by intracellular applications of inositol-1,4,5-triphosphate: differences between rats with retinal dystrophy (RCS) and normal rats. *The Journal of Membrane Biology*, 151(2), 189–200. <https://doi.org/10.1007/s002329900069>

- Streilein, J. W. (1999). Regional immunity and ocular immune privilege. *Chemical Immunology*, 73, 11–38. <https://doi.org/10.1159/000058741>
- Streilein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(2), 179–185. <https://doi.org/10.1189/jlb.1102574>
- Streilein, J. W., Ma, N., Wenkel, H., Ng, T. F., & Zamiri, P. (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Research*, 42(4), 487–495. [https://doi.org/10.1016/s0042-6989\(01\)00185-7](https://doi.org/10.1016/s0042-6989(01)00185-7)
- Sugita, S. (2009). Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 57(4), 263–268. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0030-0>
- 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. *Experimental Eye Research*, 83(6), 1459–1471. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.08.005>
- Sun, H., Tsunenari, T., Yau, K.-W., & Nathans, J. (2002). The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 4008–4013. <https://doi.org/10.1073/pnas.052692999>
- Tao, Q., & Kelly, M. E. (1996). Calcium-activated potassium current in cultured rabbit retinal pigment epithelial cells. *Current Eye Research*, 15(3), 237–246. <https://doi.org/10.3109/02713689609007617>
- Terracciano, A., Sanna, S., Uda, M., Deiana, B., Usala, G., Busonero, F., Maschio, A., Scally, M., Patriciu, N., Chen, W.-M., Distel, M. A., Slagboom, E. P., Boomsma, D. I., Villafuerte, S., Sliwerska, E., Burmeister, M., Amin, N., Janssens, A. C. J. W., van Duijn, C. M., ... Costa, P. T. J. (2010). Genome-wide association scan for five major dimensions of personality. *Molecular Psychiatry*, 15(6), 647–656. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.113>
- Thompson, D. A., & Gal, A. (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(5), 683–703. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(03\)00051-x](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(03)00051-x)
- Thoreson, W. B., & Bryson, E. J. (2004). Chloride equilibrium potential in salamander cones. *BMC Neuroscience*, 5, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-5-53>

- Thoreson, W. B., Bryson, E. J., & Rabl, K. (2003). Reciprocal interactions between calcium and chloride in rod photoreceptors. *Journal of Neurophysiology*, *90*(3), 1747–1753. <https://doi.org/10.1152/jn.00932.2002>
- Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G. M., Huxley, C., & Seabra, M. C. (2004). A general role for Rab27a in secretory cells. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(1), 332–344. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0452>
- Ueda, Y., & Steinberg, R. H. (1994). Chloride currents in freshly isolated rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*, *58*(3), 331–342. <https://doi.org/10.1006/exer.1994.1023>
- Uemura, A., Fruttiger, M., D'Amore, P. A., De Falco, S., Jousseaume, A. M., Sennlaub, F., Brunck, L. R., Johnson, K. T., Lambrou, G. N., Rittenhouse, K. D., & Langmann, T. (2021). VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Progress in Retinal and Eye Research*, *84*, 100954. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100954>
- Unsal, E., & Cubuk, M. O. (2018). The outcomes of aflibercept therapy in patients with age-related macular degeneration resistant to bevacizumab or ranibizumab. *Journal of Current Ophthalmology*, *30*(4), 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.07.002>
- Vay, L., Gu, C., & McNaughton, P. A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology*, *165*(4), 787–801. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>
- Veluthakal, R., & Thurmond, D. C. (2021). Emerging Roles of Small GTPases in Islet β -Cell Function. *Cells*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/cells10061503>
- Waldbillig, R. J., Pfeffer, B. A., Schoen, T. J., Adler, A. A., Shen-Orr, Z., Scavo, L., LeRoith, D., & Chader, G. J. (1991). Evidence for an insulin-like growth factor autocrine-paracrine system in the retinal photoreceptor-pigment epithelial cell complex. *Journal of Neurochemistry*, *57*(5), 1522–1533. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb06347.x>
- Webb, B. T., Guo, A.-Y., Maher, B. S., Zhao, Z., van den Oord, E. J., Kendler, K. S., Riley, B. P., Gillespie, N. A., Prescott, C. A., Middeldorp, C. M., Willemsen, G., de Geus, E. J., Hottenga, J.-J., Boomsma, D. I., Slagboom, E. P., Wray, N. R., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Wright, M. J., ... Hottenga, J. M. (2012). Meta-analyses of genome-wide linkage scans of anxiety-related phenotypes. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *20*(10), 1078–1084. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.47>

- Webster, L., Chignell, A. H., & Limb, G. A. (1999). Predominance of MMP-1 and MMP-2 in epiretinal and subretinal membranes of proliferative vitreoretinopathy. *Experimental Eye Research*, *68*(1), 91–98. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0585>
- Whitlock, J. M., & Hartzell, H. C. (2017). Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles. *Annual Review of Physiology*, *79*, 119–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034031>
- Wiederholt, M., & Zadunaisky, J. A. (1984). Decrease of intracellular chloride activity by furosemide in frog retinal pigment epithelium. *Current Eye Research*, *3*(4), 673–675. <https://doi.org/10.3109/02713688409003071>
- Wills, N. K., & Fong, P. (2001). CIC chloride channels in epithelia: recent progress and remaining puzzles. *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, *16*, 161–166. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.4.161>
- Wilson, S. M., Yip, R., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Zhang, Y., Novak, E. K., Swank, R. T., Russell, L. B., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (2000). A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(14), 7933–7938. <https://doi.org/10.1073/pnas.140212797>
- Wimmers, S., Halsband, C., Seyler, S., Milenkovic, V., & Strauss, O. (2008). Voltage-dependent Ca²⁺ channels, not ryanodine receptors, activate Ca²⁺-dependent BK potassium channels in human retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision*, *14*, 2340–2348.
- Wimmers, S., Karl, M. O., & Strauss, O. (2007). Ion channels in the RPE. *Progress in Retinal and Eye Research*, *26*(3), 263–301. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.12.002>
- Witmer, A. N., Vrensen, G. F. J. M., Van Noorden, C. J. F., & Schlingemann, R. O. (2003). Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, *22*(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(02\)00043-5](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(02)00043-5)
- Wittkowski, K. M., Dadurian, C., Seybold, M. P., Kim, H. S., Hoshino, A., & Lyden, D. (2018). Complex polymorphisms in endocytosis genes suggest alpha-cyclodextrin as a treatment for breast cancer. *PLoS One*, *13*(7), e0199012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199012>
- Wollmann, G., Lenzner, S., Berger, W., Rosenthal, R., Karl, M. O., & Strauss, O. (2006). Voltage-dependent ion channels in the mouse RPE: comparison with Norrie disease mice. *Vision Research*, *46*(5), 688–698. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2005.08.030>

- Wu, J., Marmorstein, A. D., Striessnig, J., & Peachey, N. S. (2007). Voltage-dependent calcium channel CaV1.3 subunits regulate the light peak of the electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*, *97*(5), 3731–3735. <https://doi.org/10.1152/jn.00146.2007>
- Wu, X., Rao, K., Bowers, M. B., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Hammer, J. A. 3rd. (2001). Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 6), 1091–1100. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.6.1091>
- Wykoff, C. C., Brown, D. M., Maldonado, M. E., & Croft, D. E. (2014). Aflibercept treatment for patients with exudative age-related macular degeneration who were incomplete responders to multiple ranibizumab injections (TURF trial). *The British Journal of Ophthalmology*, *98*(7), 951–955. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-304736>
- Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., Huang, F., Cheng, T., Coughlin, S. R., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2012). TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell*, *151*(1), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.036>
- Yonekawa, Y., Andreoli, C., Miller, J. B., Loewenstein, J. I., Sobrin, L., Elliott, D., Vavvas, D. G., Miller, J. W., & Kim, I. K. (2013). Conversion to aflibercept for chronic refractory or recurrent neovascular age-related macular degeneration. *American Journal of Ophthalmology*, *156*(1), 29–35.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.03.030>
- Yuzawa, M., Fujita, K., Wittrup-Jensen, K. U., Norenberg, C., Zeitz, O., Adachi, K., Wang, E. C. Y., Heier, J., Kaiser, P., Chong, V., & Korobelnik, J.-F. (2015). Improvement in vision-related function with intravitreal aflibercept: data from phase 3 studies in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, *122*(3), 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.optha.2014.09.024>
- Zhang, Y., Stanton, J. B., Wu, J., Yu, K., Hartzell, H. C., Peachey, N. S., Marmorstein, L. Y., & Marmorstein, A. D. (2010). Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease. *Human Molecular Genetics*, *19*(6), 1108–1118. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp583>

6 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Antonia Jousen für die Möglichkeit bedanken, im Bereich der experimentellen Ophthalmologie an der Charité zu forschen. Ohne ihre jahrelange Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen wäre diese Habilitation nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Olaf Strauß, der meine Begeisterung für die Wissenschaft im Allgemeinen und im Besonderen für die experimentelle Ophthalmologie geweckt hat. Bereits während der Doktorarbeit hat er ein inspirierendes, aber entspanntes Umfeld geschaffen, um meine eigenen wissenschaftlichen Interessen, aber auch Frustrationstoleranz zu entwickeln. Es gelang mir dank ihm, meinen Weg in Richtung selbstständige Wissenschaftlerin zu festigen und gegen alle Widrigkeiten an diesem Weg festzuhalten. Trotz, oder vielleicht gerade wegen der vielen Jahre war und ist mir die Zusammenarbeit immer eine große Freude und Bereicherung.

Auch dem Team der Experimentellen Ophthalmologie an der Charité, hier vor allem Herrn Dr. Kociok, Frau Fels und Herrn Skosyrski möchte ich für die unermüdliche Hilfe bei organisatorischen, technischen Fragen aber auch wissenschaftlichen Sachverhalten danken.

Danken möchte ich auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dechend/Müller für die großartige, bereichernde Kooperation im Rahmen der Untersuchung diabetischer und hypertensiver Endorganschäden.

Des Weiteren möchte ich an dieser Stelle den Mitarbeitern des Labors der experimentellen Ophthalmologie in Regensburg, und hier vor allem Frau Dannullis und Herrn Milenkovic danken, die mich von meinen wissenschaftlichen Anfängen an geduldig unterstützt haben.

Nicht unerwähnt sollen die vielen Doktoranden und Praktikanten bleiben, die ich über die Jahre mitbetreut habe und die mich mit ihren Fragen herausgefordert haben und mir so ermöglicht haben selbst kontinuierlich zu lernen.

Zu guter Letzt möchte ich den mir nahestehenden Personen danken, dass sie mich über die Jahre meiner wissenschaftlichen Laufbahn hinweg unterstützt und ein offenes Ohr für meine Probleme hatten. Besonderer Dank gebührt hier meinem Mann und meiner Tochter Fine, die mir täglich auf ihre individuelle Weise Verständnis entgegenbringen und mich mahnen die Prioritäten richtig zu setzen

Danke dafür!

7 ERKLÄRUNG

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift