

Beteiligung von Ionenkanälen an der Regulation der Phagozytose des Retinalen Pigmentepithels



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Vorgelegt von
Claudia Müller
aus Chemnitz**

im Jahr 2012

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Februar 2009 bis Juli 2012 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß, Experimentelle Ophthalmologie am Universitätsklinikum Regensburg.

Claudia Müller

Promotionsgesuch eingereicht am: 12.09.2012

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Olaf Strauß

Prüfungsausschuss: Prof. Prof. Dr. Richard Warth (Vorsitzender)

Prof. Dr. Olaf Strauß (1.Prüfer)

Prof. Dr. Stephan Schneuwly (2.Prüfer)

PD. Dr. Rudolph Fuchshofer (3.Prüfer)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | iv |
| Abkürzungsverzeichnis | vii |
| Zusammenfassung | 11 |
| 1. Einleitung..... | 13 |
| 1.1 Aufbau und Funktion der Retina | 13 |
| 1.1.1 Retina | 13 |
| 1.1.2 RPE | 14 |
| 1.2 Phagozytose des RPE | 16 |
| 1.2.1 Phagozytoserezeptoren..... | 17 |
| 1.2.2 Signalwege | 19 |
| 1.3 Erkrankungen des RPE mit möglicher Phagozytose Beteiligung | 21 |
| 1.3.1 Usher Syndrom..... | 21 |
| 1.3.2 Best´sche vitelliforme Makuladystrophie | 22 |
| 1.4. Bestrophin-1 | 24 |
| 1.5 Ca^{2+} und Zellfunktionen des RPE | 27 |
| 1.6 Ca^{2+} Kanäle des RPE | 28 |
| 1.6.1 Spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle..... | 28 |
| 1.6.2 Orai-1 und SOCE | 29 |
| 1.6.3 TRP Kanäle | 31 |
| 1.6.4 ATP Rezeptoren | 32 |
| 1.7 K^{+} Kanäle des RPE | 32 |
| 1.7.1 BK Kanäle | 32 |
| 1.8 Zielsetzung..... | 34 |
| 2. Material und Methoden | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1 Chemikalien und Reagenzien | 35 |
| 2.2 Verwendete Geräte | 35 |
| 2.3 Mauslinien | 37 |
| 2.4 Zellkultur | 37 |
| 2.4.1 Gewinnung und Kultur primärer muriner RPE Zellen..... | 37 |
| 2.4.2 Gewinnung und Kultur primärer porciner RPE Zellen..... | 38 |
| 2.5 siRNA Transfektion der primären porcinen RPE Zellen | 38 |
| 2.6 Isolierung von Photorezeptoraußensegmenten (OS) | 39 |
| 2.6.1 Präparation der Retinae | 40 |
| 2.6.2 Homogenisation und Dichtegradientenultrazentrifugation | 40 |
| 2.7 Messung der Phagozytose porciner RPE Zellen..... | 42 |
| 2.7.1 Fluoreszenzmarkierung der OS..... | 42 |
| 2.7.2 Phagozytose in vitro Assay | 42 |
| 2.8 Subzelluläre Fraktionierung | 42 |
| 2.9 Western Blot | 43 |
| 2.10 RealTime PCR | 43 |
| 2.11 Messung des transepithelialen Widerstandes | 44 |
| 2.12 Paraffinschnitte | 45 |
| 2.12.1 Gewebefixierung und -bearbeitung..... | 45 |
| 2.12.2 Vorbereitung für die Färbung..... | 45 |
| 2.12.3 Immunohistologische Färbungen..... | 45 |
| 2.12.4 Immunozytochemische Färbungen..... | 46 |
| 2.13 Statistische Analyse | 46 |
| 3. Ergebnisse..... | 48 |
| 3.1 Phagozytose porciner RPE Zellen in vitro | 48 |
| 3.1.1 Etablierung eines Zellkultursystems zur Messung der Phagozytose, Validierung der Methode | 48 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.2 Expression von Ca _v 1.3 Ca ²⁺ Kanälen, Bestrophin-1 und BK K ⁺ Kanälen in porcinen RPE Zellen..... | 51 |
| 3.1.3 Bestrophin-1 | 53 |
| 3.3 Ca ²⁺ Kanäle | 57 |
| 3.4 Beteiligung von BK Kanälen an der Regulation der Phagozytose | 61 |
| 3.2 Untersuchungen zur Phagozytose des RPE im Mausmodell | 62 |
| 3.2.1 Phagozytose in vivo: Untersuchungen im Ca _v 1.3 -/- Mausmodell | 64 |
| 3.2.2 Phagozytose in vivo: Untersuchungen im BK-/- Mausmodell | 66 |
| 3.2.2.1 Strukturelle Veränderungen in der Retina von BK-/- Mäusen | 68 |
| 3.2.2.2 Untersuchungen zu Lipofuszinablagerungen im RPE von BK-/- Mäusen | 69 |
| 3.2.2.3 Untersuchung des Rhodopsingehalts in Retinae von BK-/- Mäusen | 70 |
| 4. Diskussion | 72 |
| 4.1. Untersuchungen zur Beteiligung von Ionenkanälen an der Regulation der Phagozytose in vitro | 72 |
| 4.1.1 Zellkultursystem zur Messung der Phagozytose primärer porciner RPE Zellen in vitro | 72 |
| 4.1.2 Expression von Ca _v 1.3, Bestrophin-1 und BK Kanälen in porcinen RPE Zellen..... | 75 |
| 4.1.3 Bestrophin-1 | 77 |
| 4.1.4 Ca ²⁺ Kanäle | 81 |
| 4.1.5 BK K ⁺ Kanäle..... | 87 |
| 4.1.6 Modell zur Ionenkanalinteraktion in der Regulation der Phagozytose | 88 |
| 4.2 Untersuchungen zur Beteiligung von Ionenkanälen an der Regulation der Phagozytose des RPE in vivo | 91 |
| 4.2.1 Untersuchungen im Ca _v 1.3-/- und BK-/- Mausmodell | 92 |
| Literaturverzeichnis | 97 |
| Danksagung | 112 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| 2-APB | 2-Aminoethoxydiphenyl borate |
| aa | Aminosäure |
| ATP | adenosine triphosphate |
| BEST-1 | Bestrophin-1 Protein |
| BK | (engl. „Big Potassium“) K ⁺ Ionenkanäle |
| bp | Basen Paare |
| BSA | bovine serum albumin |
| BVMD | Best'sche Vitelliforme Makula Dystrophie |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| [Ca ²⁺] _i | intrazelluläre Calcium Konzentration |
| Ca _v | spannungsabhängige Ca ²⁺ Ionenkanäle |
| CAMKII | Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II |
| cAMP | Zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat |
| cDNA | Komplementäre Desoxyribonucleinsäure |
| Cl - | Chlorid |
| CLC | Chlorid Kanäle |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| C-Terminus | Carboxyl Terminus |
| DIC | differential interference contrast |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| EOG | Electro-okulogramm |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERG | Elektro-retinogram |
| FAK | Fokale Adhäsions Kinase |
| FBS | Fetales Kälberserum |
| HEK | Zelllinie „human embryonic kidney „ |
| HRP | Meerretich Peroxidase |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-trisphosphat |
| IP ₃ R | Inositol 1,4,5-trisphosphate Rezeptor |
| K ⁺ | Kalium |

| | |
|-----------------|--|
| KI | knock-in |
| KO | knock-out |
| LP | Lichtanstieg |
| m | Millimeter |
| M | mol/liter |
| MDCK | Zelllinie "Madin-Darby Canine Kidney" |
| MerTK | Mer Tyrosine Kinase |
| min | Minute |
| M | micro |
| ms | Maus |
| n | nano, Anzahl |
| n.s | nicht signifikant |
| Na ⁺ | Natrium |
| N-Terminus | Amino Terminus |
| Orai | ORAI Ionenkanal (calcium release-activated calcium channel) |
| OS | Photorezeptoraußensegmente (engl. "outer segments") |
| P2X | Purinerger Rezeptor P2X |
| P2Y | Purinerger Rezeptor P2Y |
| PBS | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline) |
| Pen | Penicillin |
| PLC | Phospholipase C |
| qPCR | quantitative Polymerase Kettenreaktion |
| RCS | Royal College of Surgeons |
| RPE | Retinales Pigmentepithel |
| RYR | Ryanodinrezeptor |
| s | Sekunden |
| SDS-PAGE | Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamide Gelelektrophorese |
| SERCA | Calciumpumpe des sarco- und endoplasmatischen Retikulums |
| siRNA | small interfering RNA |
| SOCE | durch Speicherentleerung aktivierter Ca ²⁺ Einstrom (store-operated Ca ²⁺ entry) |
| STIM | stromal interaction molecule |
| Strep | Streptomycin |
| TAMRA | 5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester |
| TLR | Toll like Rezeptor |
| TM | Transmembrandomäne |

| | |
|----------|---|
| TRP | (engl. “transient receptor potential“) Kationenkanäle |
| USH | Usher Syndrom |
| VMD2 | vitelliform macular dystrophy Gen |
| WT | wildtyp |
| Ω | ohm |

Zusammenfassung

In der äußeren Retina besteht eine enge funktionelle Interaktion zwischen retinalem Pigmentepithel (RPE) und Photorezeptoren. Eine wichtige Aufgabe des RPE ist hier die zirkadian regulierte Phagozytose der äußeren Segmente der Photorezeptoren, welche permanent erneuert werden. Ist diese empfindlich genau geregelte Interaktion beider Zellgruppen gestört, kann es zu schwerwiegenden Erkrankungen, verbunden mit dem Verlust von Photorezeptoren, und damit zur Erblindung kommen. Einige für die Interaktion wichtige Rezeptoren und Moleküle sind bekannt. Die Regulation des Phagozytoseprozesses im RPE weiterführend nach dem Rezeptorkontakt ist jedoch nicht komplett geklärt.

In der Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Ionenkanäle auf die Regulation der Phagozytose überprüft werden. Zur Untersuchung dieses Ansatzes wurde ein in-vitro Modellsystem etabliert, bei dem die Phagozytose in primären porcinen RPE Zellen, denen isolierte Außensegmente von Photorezeptoren zugefügt werden, untersucht wird. Hier konnte durch pharmakologische Blockierung gezeigt werden, dass L-Typ Ca^{2+} Kanäle und möglicherweise TRPV Kanäle durch Generierung von Ca^{2+} Signalen, welche für den Ablauf weiterer Signalkaskaden während des Phagozytoseprozesses benötigt werden, beteiligt sind.

Bestrophin-1 interagiert direkt mit den β -Untereinheiten der $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} Kanäle des RPE. Dabei führt die Interaktion mit dem Bestrophin-1 zur Hemmung der Ca^{2+} Kanalaktivität. Um einem solchen Effekt auf die Ionenkanäle nachzugehen wurden über differentielle Zentrifugation, mit Hilfe von Sucrosegradienten, Erkenntnisse zur subzellulären Lokalisation von Bestrophin-1 gewonnen. Hier zeigte sich, dass Bestrophin-1 nicht in den gleichen Membranfraktionen vorhanden war, wie klassische Zellmembranproteine, sondern in Fraktionen mit einer Anreicherung an Proteinen cytosolischer vesikulärer Membranen. Dies lässt auf eine Lokalisation in der Membran intrazellulärer Organellen nahe der Zellmembran schließen. Weiterhin konnte ein funktioneller Einfluss von Bestrophin-1 auf die Phagozytose über seine modulatorische Aktivität an $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} Kanälen in-vitro gezeigt werden. Der siRNA knock-down von Bestrophin-1 führte hier zu einer erhöhten Phagozytoserate, was einen aktivierenden Einfluss der L-Typ Kanäle auf die Phagozytose bestätigt.

Im RPE ist eine direkte funktionelle Kopplung der Aktivität von spannungs- und Ca^{2+} -aktivierten K^+ Kanälen (BK) und der Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen über einen negativen feedback Kontrollmechanismus bekannt. Bei pharmakologischer Inhibition des BK K^+ Kanals in Phagozytose in-vitro Experimenten kommt es ebenfalls zu einer reduzierten Phagozytoseaktivität, was nahe legt, dass dieser direkte Antagonismus keine vordringliche Rolle für die Phagozytose-Regulation spielt.

Weiterführend wurde die Rolle des $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} Kanals in der Regulation der Phagozytose in-vivo untersucht. Dazu standen ein knock-out Mausmodell für $\text{Ca}_v1.3$ und BK Kanal zur Verfügung. Da es sich bei der Phagozytose des RPEs um einen zirkadian regulierten Prozess handelt, wurden mittels immunhistochemischer Färbungen der Retina zu verschiedenen Tageszeiten die Anzahl der Phagosomen im RPE ermittelt, was dessen phagozytärer Aktivität entspricht. Es zeigte sich dabei im $\text{Ca}_v1.3$ Mausmodell ein Unterschied in der morgendlichen Peak-Aktivität, und über den Tagesverlauf hin findet sich eine höhere Anzahl von Phagosomen in den knock-out Tieren im Vergleich zu den wildtypen.

Im zweiten Mausmodell, defizient für BK K^+ Kanal, zeigte sich ein veränderter zirkadianer Rhythmus in der morgendlichen Peak Aktivität der Phagozytose und im Tagesverlauf eine geringere Phagozytoseaktivität. In folgenden Untersuchungen zeigte sich an diesem Mausmodell ein weiterer Phänotyp im Auge. Histologisch konnte eine Verkürzung der Photorezeptoraußensegmente festgestellt werden.

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Retina

1.1.1 Retina

Die Retina befindet sich im hinteren Augenabschnitt zwischen Glaskörper (Vitreus) und Aderhaut (Choroid). Sie besteht hauptsächlich aus Neuronen (Photorezeptoren, Bipolar Zellen, Amakrin Zellen, Horizontal Zellen, Ganglien Zellen), Müller Zellen, Astrozyten und dem Pigmentepithel (RPE). Die retinalen Zellen sind dabei in neun anatomisch unterscheidbare Schichten gegliedert (Abb.1.1).

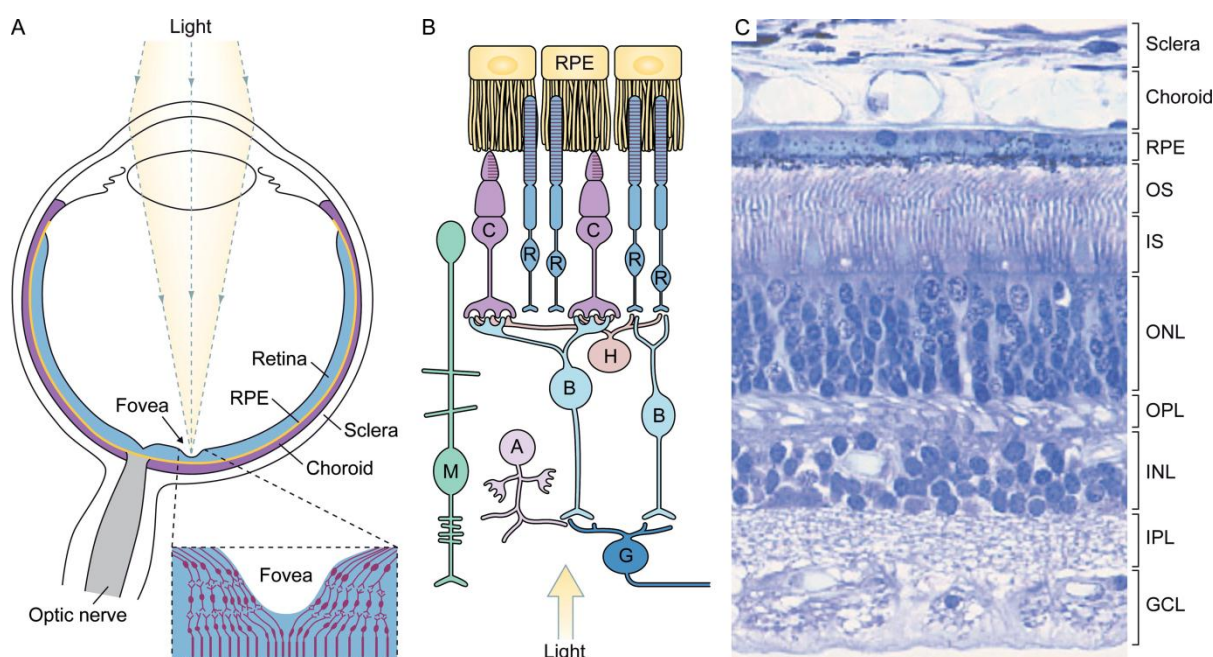


Abbildung 1.1: Aufbau der Retina. A Querschnitt durch das menschliche Auge. B Schematische Darstellung der Organisation retinaler Zellen. Stäbchen (R), Zapfen (C), Bipolarzellen (B), Horizontalzellen (H), Amakrinzellen (A), Ganglienzellen (G), Müllerzellen (M), Retinales Pigmentepithel (RPE), C Gewebeschnitt durch die Netzhaut mit Darstellung der einzelnen Schichten. Die Kerne der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (ONL). Die Kerne der Bipolar-, Amakrin-, Horizontal- und Müllerzellen sind in der inneren Körnerschicht (INL) zu finden. Die Kerne der Ganglienzellen bilden die Ganglienzellschicht (GCL). Die äußere plexiforme Schicht (OPL) beinhaltet die Ausläufer und synaptischen Enden der Photorezeptoren, Horizontal- und Bipolarzellen. Die innere plexiforme Schicht (IPL) beinhaltet die Ausläufer und Enden von Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen. Photorezeptoraußensegment (OS), -innensegment (IS). (Sung and Chuang 2010)

Licht muss zuerst die Retina durchdringen, bevor es die lichtsensitiven Zapfen und Stäbchen der äußeren Retina erreicht. Im humanen Auge befinden sich peripher ~120 Millionen Stäbchenzellen, wogegen im zentralen Bereich (Fovea centralis) hauptsächlich die ~6 Millionen Zapfen vorliegen. Photorezeptoren sind in Außensegment, Innensegment, Zellkörper und Synapse gegliedert. Die Außensegmente der Stäbchen sind zylinderförmig, und bestehen aus Stapeln vieler übereinanderliegender Disks, flacher, einzelner, membranumschlossener „Scheibchen“ (~1000). Der strukturelle Aufbau der Zapfenaußensegmente unterscheidet sich von dem der Stäbchen, indem er eine konische Form und Einstülpungen der Zellmembran aufweist. Die Verbindung zwischen Außen- und Innensegment erfolgt über ein Cilium.

1.1.2 RPE

Das RPE ist ein einschichtiges Epithelium hexagonaler Zellen, was einen hohen Gehalt an Melanosomen aufweist (Boulton and Dayhaw-Barker 2001). Zwischen apikaler und basolateraler Seite der Zelle bestehen morphologische und funktionelle Unterschiede (Strauss 2005). An der apikalen Membran steht es mit Außensegmenten (OS) der Photorezeptoren in Kontakt. Diese sind hier von langen apikalen Zellfortsätzen, den Mikrovilli der RPE Zellen, umgeben (Abb.1.2). Der subretinale Spalt zwischen Photorezeptoren und RPE ist mit Interphotorezeptormatrix (IPM) ausgefüllt, welche für die Interaktion der beiden Zellgruppen von großer Bedeutung ist. Die Adhäsion der Retina am RPE wird aber vor allem durch den Flüssigkeitstransport aus dem Subretinalraum in Richtung Choroidea aufrechterhalten. Die funktionelle Einheit von Photorezeptoren und RPE ist deutlich erkennbar, wenn durch Mutationen in RPE Proteinen die Funktion des RPEs gestört ist, und es zu einer Degeneration der Photorezeptoren kommt (z.B. MerTK) (Chaitin, Hall et al. 1983; Steinberg 1985). Umgedreht führen Gendefekte in den Photorezeptoren zur Degeneration des RPE (z.B. ABCR) (Molday and Zhang 2010). Die RPE Zelle grenzt basal an die Bruch'sche Membran, bildet eine epitheliale Barriere hin zum Gefäßsystem der Choroidea, und kontrolliert als Blut-Retina-Schranke Versorgung und Stoffaustausch zwischen Gefäßen der Choroidea und der äußeren Retina (Bok 1993; Rizzolo 1997; Rizzolo 2007). Basal weist die

Zellmembran Faltungen auf, die eine Oberflächenvergrößerung für Absorption und Sekretion darstellen.

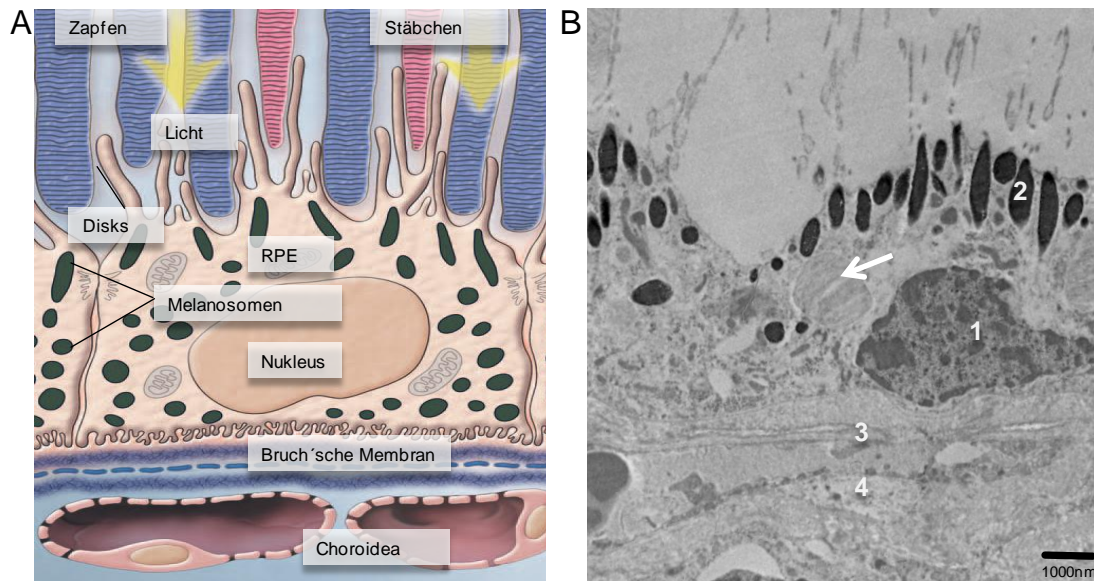


Abbildung 1.2: RPE Zelle. A Schematische Darstellung einer RPE Zelle (modifiziert nach Paulus de Jong 2006), B Elektronenmikroskopische Aufnahme porciner RPE Zellen. Nukleus (1), Melanosomen (2), Bruch'sche Membran (3), Choroidea (4), Phagosomen (Pfeil) (Mit Dank an Fr. Schimmel, Arbeitsgruppe Prof. Tamm, Institut für Anatomie der Universität Regensburg).

Das RPE übernimmt Aufgaben, die für die Funktion der Photorezeptoren essentiell sind (Strauss 2005). Die Lichteinstrahlung, der die Retina ausgesetzt ist, kann zu schädigenden photooxidativen Reaktionen bis hin zur Retinadegeneration führen (Alm and Bill 1972; Alm and Bill 1972). Die im RPE enthaltenen Melanosomen dienen dem Schutz der Photorezeptoren durch Absorption von Lichtenergie (Boulton and Dayhaw-Barker 2001). Ein weiteres lichtabsorbierendes Pigment des RPE ist Lipofuszin. Mit zunehmendem Alter akkumuliert es im RPE, wobei angenommen wird, dass der Grund dafür ein unvollständiger Verdau der phagozytierten OS ist (Miceli, Liles et al. 1994). Bei einer Reihe retinaler Erkrankungen kommt es frühzeitig zu einer so starken Anreicherung von Lipofuszin, dass zelltoxische Konzentrationen erreicht werden. Im RPE liegt weiterhin eine große Menge an enzymatischen Antioxidantien vor, und Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen können behoben werden (Newsome, Dobard et al. 1990; Miceli, Liles et al. 1994).

RPE Zellen dienen dem Transport von Ionen, Wasser und Metaboliten vom subretinalen Raum hin zum Blut (Steinberg 1985; Miller and Edelman 1990; Hamann 2002; Strauss 2005). Nährstoffe wie Glucose, Vitamin A oder Fettsäuren werden in Gegenrichtung zur Versorgung der Photorezeptoren geliefert. Das RPE sichert die Erregbarkeit der Photorezeptoren. Es stellt einen Speicher für Vitamin A dar, nimmt das nach Lichtabsorption gebildete *all-trans*-retinal auf, und sorgt für eine enzymatische Regeneration zurück in *11-cis*-retinal, wozu Photorezeptoren selbst nicht in der Lage sind. Das RPE versorgt schließlich die Photorezeptoren wieder mit erregbarem Retinal (Baehr, Wu et al. 2003; Besch, Jagle et al. 2003). Es sorgt für eine stabile Ionenkomposition im Subretinalraum (Miller and Edelman 1990). Eine Reihe von Wachstumsfaktoren und immunsuppressiver Faktoren wird durch das RPE sezerniert (Streilein, Ma et al. 2002; Ishida, Panjwani et al. 2003). Die Phagozytose der OS durch das RPE ermöglicht nach dem Verdau Recycling und Rückführung wichtiger Substanzen wie Retinal, um die OS von der Photorezeptorbasis aus nachzubilden (Kevany and Palczewski 2010). Mit seinen vielfältigen Funktionen trägt das RPE weiterhin zum Erhalt struktureller Integrität der Retina und der Ausbildung eines immunprivilegierten Raumes im Auge bei.

1.2 Phagozytose des RPE

Lebenslang unterziehen sich Photorezeptorzellen einem täglichen Erneuerungsprozess, um Schädigungen durch Anreicherung von photooxidativen Produkten vorzubeugen (Young 1967). Dabei werden die Photorezeptoraußensegmente (OS) regelmäßig vom Cilium her nachgebildet (Young and Droz 1968; Young and Bok 1969; Young 1976). Die distalen Enden der OS, welche die größten Mengen an geschädigten Proteinen und Lipiden enthalten, werden regelmäßig abgeschnürt. (Young 1967; Young and Bok 1969; Anderson, Fisher et al. 1978). Durch koordinierte Abstoßung und Neubildung wird eine konstante Länge der OS aufrechterhalten. Abgeschnürte OS Bruchstücke werden vom RPE phagozytiert. Im RPE werden sie abgebaut, verdaut, wichtige Moleküle recycelt, und den Photorezeptoren erneut zur Verfügung gestellt (Bibb and Young 1974; Bazan, Gordon et al. 1992; Rodriguez de Turco, Parkins et al. 1999). Der Prozess der OS Abstoßung und Phagozytose muss streng koordiniert zwischen RPE und Photorezeptoren ablaufen, und steht dabei unter zirkadianer Kontrolle (LaVail

1976; O'Day and Young 1978; Besharse and Hollyfield 1979; Flannery and Fisher 1984). Untersuchungen zum zirkadianen Rhythmus der Phagozytose von Stäbchen belegen einheitlich eine verstärkte Phagozytoseaktivität am Morgen, in den ersten 2h nach Anschalten des Lichtes (Young 1978; LaVail 1980). Für die Zapfen dagegen gibt es weit weniger Untersuchungen, und die Beobachtungen sind je nach gewähltem Tiermodell unterschiedlich. Die tagaktive Nagetierspezies *Arvicanthis ansorgei*, die eine zapfenreiche Retina besitzt, zeigt den gleichen zeitlichen Verlauf in der Phagozytose der Zapfen und der Stäbchen (Bobu and Hicks 2009). In *Spermophilus* Arten dagegen ist eine vermehrte Phagozytose von Zapfen OS nach Beginn der Dunkelphase beschrieben (Long, Fisher et al. 1986).

Die zirkadiane Kontrolle der Prozesse der OS Abschnürung und Phagozytose wird durch retinale zirkadiane Uhren, unabhängig vom Suprachiasmatischen Nucleus (SCN), kontrolliert (Cahill and Besharse 1993; Terman, Reme et al. 1993; Grace, Wang et al. 1996). Unterschiedliche retinale Zellen (Photorezeptor-, Bipolar-, Ganlien-, Amakrine-, Horizontale Zellen) beinhalten alle Komponenten der „molekularen Uhren“, und ermöglichen der Retina verschiedene Anpassungsmechanismen an die stark unterschiedlichen Beleuchtungsverhältnisse zwischen Tag und Nacht vorzunehmen (Guido, Garbarino-Pico et al.). Wie die zirkadiane Uhr den Start der OS Phagozytose kontrolliert, ist nicht richtig verstanden. Es wird angenommen, dass die Regulierung über das Dopamin/Melatonin System erfolgt, durch welches retinale Oszillatoren diese und andere Rhythmen kontrollieren. (Besharse and Dunis 1983)

1.2.1 Phagozytoserezeptoren

Der molekulare Mechanismus, der von RPE Zellen zur OS Phagozytose genutzt wird, ist dem Mechanismus von Phagozyten zur Entfernung apoptotischer Zellen sehr ähnlich (Savill, Dransfield et al. 1990; Albert, Pearce et al. 1998). Die Erkennung der OS durch das RPE erfolgt ähnlich wie im Falle apoptotischer Zellen durch Makrophagen über Phospholipide mit terminalen primären Amingruppen in der Zellmembran der OS, wie Phosphatidylserine (PS). Diese normalerweise ausschließlich intrazellulär vorhandenen Phospholipide werden als „Fress-Signal“ von den apoptotischen Zellen extrazellulär exponiert (Fadok, Voelker et al. 1992; Krahling, Callahan et al. 1999). Frische RPE Zellen können PS-haltige Liposomen

erkennen (Ryeom, Silverstein et al. 1996). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch isolierte OS Partikel extrazellulär PS exponieren, und deren Blockade zur Verringerung der Anbindung und Aufnahme durch RPE Zellen in Kultur führt. Die Exposition von PS ist in der Mausretina auf die distalen Enden der OS beschränkt und erfolgt rhythmisch, mit einer verstärkten Exposition kurz nach Eintritt in die Lichtphase (Ruggiero, Connor et al. 2012).

Nach der Erkennung durch die RPE Zelle erfolgt die Anbindung der OS als ein spezifischer, rezeptorvermittelter Prozess (Hall and Abrams 1987). Der Makrophagen-Rezeptor CD36 bindet direkt an PS der OS Membran, unterstützt so die Anbindung und reguliert die Aufnahme (Ryeom, Silverstein et al. 1996; Ryeom, Sparrow et al. 1996; Sparrow, Ryeom et al. 1997; Finnemann and Silverstein 2001). TLR4 spielt eine regulierende Rolle in der OS Aufnahme und Degradierung (Kindzelskii, Elner et al. 2004). Integrinrezeptoren $\alpha\beta5$ der apikalen Zellmembran binden ihr Substrat dagegen nicht direkt, sondern erkennen vielmehr extrazelluläre, lösliche „Brücken“-Proteine, durch die OS Partikel opsonisiert sind (Finnemann and Rodriguez-Boulan 1999; Wu, Tibrewal et al. 2006). Das in den Subretinalraum sezernierte Protein MFG-E8 (engl. milk fat globule-EGF factor 8) dient als Ligand zur Bindung an $\alpha\beta5$ (Nandrot, Anand et al. 2007). Mittels Blockierung $\alpha\beta5$ spezifischer Antikörper wurde eine reduzierte Anbindung der OS ans RPE beobachtet, die Phagozytose bereits gebundener Partikel war nicht beeinträchtigt (Finnemann, Bonilha et al. 1997). Mäuse ohne $\beta5$ Integrinuntereinheit oder MFG-E8 zeigen nicht mehr den beschriebenen morgendlichen Peak in der Phagosomenzahl, sondern nur eine basale Aufnahmekapazität. Weiterhin weisen ältere $\beta5$ -/- Mäuse aufgrund der gestörten Phagozytose Sehverluste und eine Anreicherung von autofluoreszenten Ablagerungen im RPE auf (Nandrot, Kim et al. 2004).

Für die Aufnahme der OS ist die Rezeptortyrosinkinase MerTK unverzichtbar (Feng, Yasumura et al. 2002). Mutationen der MerTK konnten als Pathomechanismus bei Retinitis pigmentosa identifiziert werden (Bok and Hall 1971; Edwards and Szamier 1977; D'Cruz, Yasumura et al. 2000; Vollrath, Feng et al. 2001; Duncan, LaVail et al. 2003). Untersuchungen am Tiermodell der Royal College of Surgeons Ratten (RCS) zeigten, dass ihre RPE Zellen in der Lage waren die OS zu binden, eine Internalisierung der OS aber nicht möglich war (Goldman and O'Brien 1978; Chaitin, Hall et al. 1983). Interessanterweise sind RCS RPE Zellen aber in der Lage Latex

Beads aufzunehmen, was auf eine generelle Phagozytosefähigkeit schließen lässt (Edwards and Szamier 1977; Heth and Marescalchi 1994). Ähnlich wie $\alpha\beta5$ Integrin erkennt MerTK seinen Liganden nicht direkt, sondern nutzt höchstwahrscheinlich als „Brücken“-Proteine Gas6 und ProteinS für die Bindung an PS, die zur MerTK abhängigen OS Aufnahme nötig sind (Hall, Prieto et al. 2001; Hall, Obin et al. 2002). Mit Tubby und Tulp1 wurden zwei weitere MerTK Liganden gefunden, die über einen PS unabhängigen Mechanismus, als Brückenproteine fungieren. Es wurde gezeigt, dass beide MerTK binden und aktivieren, sowie die OS Phagozytose stimulieren (Caberoy, Zhou et al. 2010). Tetraspanin CD81, welches selbst nicht als direkter Rezeptor für OS fungiert, unterstützt die OS Anbindung über eine funktionelle Interaktion mit $\alpha\beta5$ Integrinen (Chang and Finnemann 2007).

1.2.2 Signalwege

Die Initiation und Regulation der Phagozytose kann an kultivierten Zellen untersucht werden, denen isolierte OS zugeführt werden (Hall and Abrams 1987; Heth and Marescalchi 1994; Finnemann, Bonilha et al. 1997). Nach der spezifischen Bindung der OS an der apikalen Membran der RPE Zelle wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die zur Aufnahme der gebundenen OS führt. $\alpha\beta5$ Integrin Ligation bei OS Kontakt mobilisiert FAK (engl. focal adhesion kinase) zum apikalen RPE. Diese Initiierung der Phagozytose geht mit einer Tyrosinphosphorylierung der FAK einher (Finnemann 2003). Die aktivierte FAK interagiert mit Rezeptor Tyrosin kinase *c-mer* (MerTK). Weiterhin induziert die $\alpha\beta5$ Integrin Ligandenbindung die F-Aktin Rekrutierung zu oberflächengebundenen phagocytischen Partikeln durch aktivierte Rac1GTPase, unabhängig von MerTK/FAK. Eine verminderte Rac1 Expression behindert die OS Partikelaufnahme (Mao and Finnemann 2012).

Ligandenbindung führt zur Autophosphorylierung der MerTK, und damit zur Übertragung des extrazellulären Signals in die Aktivierung der IP_3 Signalkaskade, als wichtigen intrazellulären Signalweg während der Phagozytose (Feng, Yasumura et al. 2002; Finnemann 2003). Hierbei führt die Aktivierung von PLC zur Generierung einer erhöhten intrazellulären Konzentration von IP_3 , was in Zellen ohne MerTK nicht beobachtet werden kann (Heth and Schmidt 1991; Heth and Marescalchi 1994). Der Anstieg der IP_3 Konzentration geht mit dem Start der Phagozytose und einer

verstärkten Phosphorylierung von Proteinen einher (Heth and Schmidt 1992). Nach OS Zugabe zu RPE Zellen wurde neben MerTK und FAK auch eine vermehrte Phosphorylierung von Src Kinase beobachtet. IP₃ Signale führen zu einer nachfolgenden Freisetzung von Ca²⁺ aus den Speichern des ER.

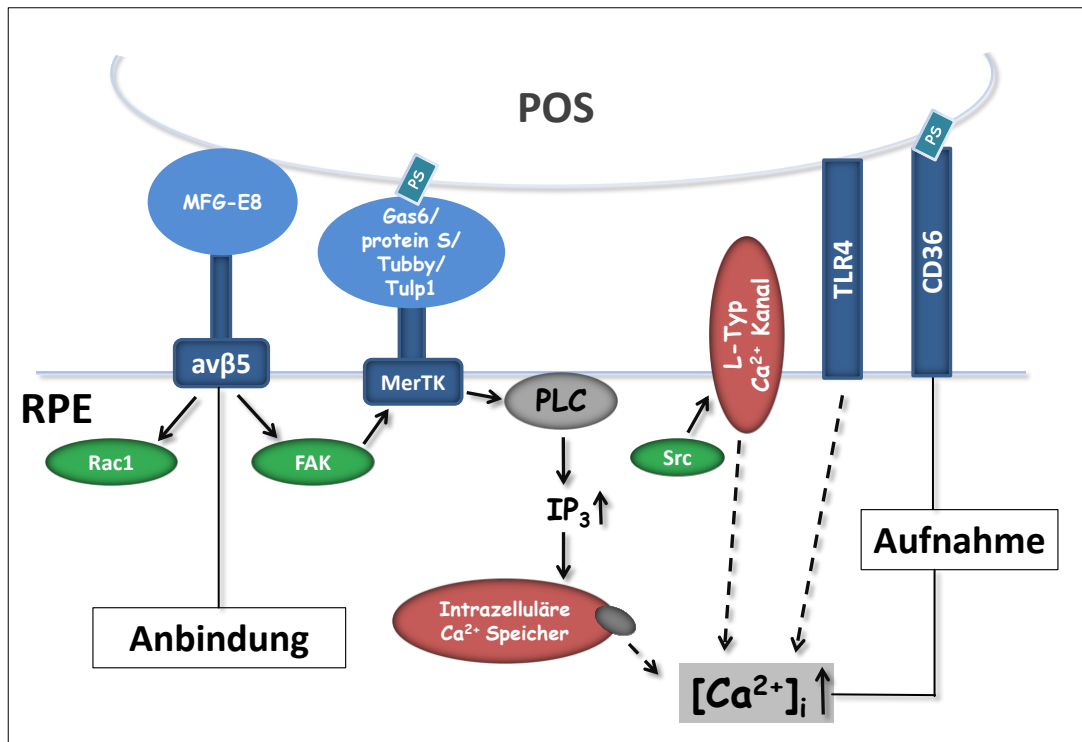


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Zellmembranrezeptoren und intrazellulären Signalwege, die in die Regulation der Phagozytose von OS durch RPE Zellen involviert sind. Die Phagozytose beginnt mit Anbindung der OS. Dieser Vorgang wird in ein intrazelluläres Signal übertragen, einem Anstieg der intrazellulären IP₃ Konzentration, die zur Aufnahme der gebundenen OS Membranen führt. Die Anbindung wird durch αvβ5 Integrin vermittelt, und die Aktivierung der IP₃ Signalkaskade erfolgt über die Rezeptor Tyrosin Kinase MerTK. Der Makrophagen Rezeptor CD36 ist in die Aufnahme involviert. Eine koordinierte Signalübertragung zwischen αvβ5 Integrin und MerTK erfolgt durch FAK. Die [Ca²⁺]_i ist ein zentraler sekundärer Botenstoff im Phagozytoseprozess. Die Ca²⁺ Homöostase während des Prozesses wird durch die Ca²⁺ Freisetzung aus intrazellulären Speichern, und dem Ca²⁺ Einstrom über L-Typ Kanäle der Membran, welche durch zytosolische Src Kinasen aktiviert werden können, reguliert. Weiterhin nimmt auch der Rezeptor TLR4 Einfluss auf die [Ca²⁺]_i. CD36, Makrophagen Phagozytose Rezeptor; FAK, focal adhesion kinase; Gas6, growth-arrest-specific protein 6; MerTK, Rezeptor Tyrosin Kinase *c-mer*; PLC, Phospholipase C; POS, Photorezeptoraußensegmente; TLR4, toll-like Rezeptor 4; Rac1, Rac1GTPase; MFG-E8, milk fat globule-EGF factor 8; PS, Phosphatidylserine; IP₃, 1,4,5-Inositoltrisphosphat.

Andererseits wurden pharmakologisch induzierte Aktivierung von PKC und Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_i$ als ein Terminationssignal der Phagozytose identifiziert (Hall, Abrams et al. 1991). Im RPE sind oszillierende Ca^{2+} Signale nach Kontakt der Zellen mit OS beschrieben, die genauere Lokalisation wurde allerdings nicht untersucht (Kindzelskii, Elner et al. 2004). Im RPE ist Ca^{2+} für die Phagozytose notwendig (Hall, Prieto et al. 2001). Annexin A2, ein in seiner Funktion Ca^{2+} abhängiges Protein, was in den RPE Zellen apikal exprimiert ist, dient als Regulator der Aktin-Dynamik während der frühen Stadien der OS Phagozytose (Law, Ling et al. 2009). Extrazelluläres Ca^{2+} wird benötigt für die Gas6 und ProteinS abhängige Bindung der OS an MerTK Rezeptoren und die nachfolgende Aufnahme durch das RPE (Hall, Prieto et al. 2001; Hall, Obin et al. 2002; Hall, Obin et al. 2005). IP_3 / Ca^{2+} Signalwege spielen eine Rolle in der Initiation der Phagozytose. Das cAMP System sekundärer Botenstoffe scheint dagegen eine Rolle in der Modulation der Phagozytose zu spielen. Dabei hat ein pharmakologisch induzierter erhöhter cAMP Gehalt eine reduzierte OS Aufnahme zur Folge (Edwards and Flaherty 1986; Hall, Abrams et al. 1993).

1.3 Erkrankungen des RPE mit möglicher Phagozytose Beteiligung

1.3.1 Usher Syndrom

Das Usher Syndrom (USH) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mit Taubheit und progressiver Retinadegeneration einhergeht. Die 3 Subtypen (USH 1, 2, 3) unterscheiden sich klinisch durch Ausmaß und Beginn der Gehörlosigkeit, eine Retinadegeneration liegt immer vor (Smith, Berlin et al. 1994). USH ist genetisch heterogen. Dabei sind bislang 9 Gene mit Mutationen bekannt, die zur Erkrankung führen (Williams 2008). Für etwa 20% der Erkrankungsfälle sind die zugrundeliegenden Mutationen noch unbekannt (Bolz 2009). USH Proteine (Myosin-7A, Harmonin, Cadherin-23, Protocadherin-15, SANS, Usherin, GPR98, Whirlin, Clarin-1) gehören sehr unterschiedlichen Proteinfamilien an, sind in Innenohr Haarzellen und der Netzhaut zu finden, und interagieren dort vermutlich funktionell (Boeda, El-Amraoui et al. 2002; Adato, Michel et al. 2005; Kremer, van Wijk et al. 2006). Dadurch, dass unterschiedliche Typen des USH einen ähnlichen klinischen

Phänotyp erzeugen, scheint die Hypothese einleuchtend, dass die Genmutationen einen gemeinsamen zellulären Mechanismus betreffen. In vitro wurden Interaktionen zwischen den USH Proteinen beobachtet, dennoch ist die Funktion in der Retina weniger klar. Es wird angenommen, dass die USH Proteine in einer Art „molekularen Motor“ zusammenarbeiten, und am Ciliartransport im Photorezeptor beteiligt sind (Udovichenko, Gibbs et al. 2002; Inoue and Ikebe 2003). Myosin-7A defiziente shaker-1 Mäuse, zeigen eine abnorme Akkumulation von Opsin im Cilium der Photorezeptoren und eine reduzierte Erneuerung der OS Membranen (Liu, Udovichenko et al. 1999). Andere Lokalisationen des USH Proteinnetzwerkes sind Photorezeptorsynapsen (Reiners, Marker et al. 2005). Harmonin stellt in diesen Komplexen das zentrale Gerüstprotein dar, wobei es im Cilium nicht zur Verfügung steht (Reiners, Reidel et al. 2003; Reiners, van Wijk et al. 2005).

Im Bereich des Ciliums könnte auch Myosin-7A mit anderen USH Proteinen interagieren. Das meiste Myosin-7A der Retina befindet sich jedoch apikal im RPE, wo es das einzige USH Protein zu sein scheint (Hasson, Heintzelman et al. 1995). Hier ist es für den Transport von Organellen, Phagosomen und Melanosomen, zuständig. Sowohl Zebrafische (mariner) als auch Mäuse mit Myosin-7A Mutationen (shaker-1) zeigen eine gestörte Lokalisation und Motilität von Melanosomen im RPE (Liu, Ondek et al. 1998; Gibbs, Azarian et al. 2004). Die Migration von Melanosomen hat eine wichtige Bedeutung für die Lichtadaptation. Darüber hinaus ist die Phagozytosefunktion des RPE, welche von essentieller Bedeutung für die kontinuierliche Erneuerung der OS ist, gestört (Gibbs, Kitamoto et al. 2003). Phagosomen brauchen länger um zum basalen RPE zu gelangen, und werden langsamer verdaut.

1.3.2 Best'sche vitelliforme Makuladystrophie

Bestrophin-1 wird vom *BEST1* Gen codiert, und ist als integrales Transmembranprotein im RPE vorhanden (Marmorstein, Marmorstein et al. 2000). *BEST1* Mutationen führen zu vererbten Degenerationen der Retina, wie der Best'schen vitelliformen Makuladystrophie (Morbus Best, BMD) (Marquardt, Stohr et al. 1998; Petrukhin, Koisti et al. 1998; Stohr, Marquardt et al. 1998). Aber auch weitere sehr heterogene Gruppen von Erkrankungen wie die adulte vitelliforme Makuladystrophie (AVMD) oder Vitreoretinchoroidopathie (ADVIRC), mit Mutationen

im *BEST1* Gen, sind bekannt (Allikmets, Seddon et al. 1999; White, Marquardt et al. 2000; Yardley, Leroy et al. 2004; Xiao, Hartzell et al. 2010). Morbus Best ist charakterisiert durch eine extreme Variabilität in der Ausbildung der klinischen Symptome (Clemett 1991; Pollack, Kreuz et al. 2005; Boon, Klevering et al. 2009). Die meisten Träger von Mutationen weisen früh einen verminderten Hellanstieg im Elektrokulogramm (EOG) auf (Arden, Barrada et al. 1962; Deutman 1969; Brown, Marmor et al. 2006). Der Ausbruch erster Krankheitssymptome erfolgt meist viel später und der Krankheitsverlauf ist nicht voraussehbar (Clemett 1991; Wabbels, Preising et al. 2006).

Bei dieser autosomal-dominanten Erkrankung der zentralen Netzhaut, mit juvenilem Beginn, kommt es zu eidotterartigen Läsionen und verstärkten Ablagerungen von gelb pigmentiertem Material im subretinal und sub-RPE Raum (Frangieh, Green et al. 1982; Weingeist, Kobrin et al. 1982; Renner, Tillack et al. 2005). Im Bereich der Makula erfolgt die Ablösungen der neuronalen Retina, gefolgt durch das Absterben von Photorezeptoren und dem Verlust des zentralen Sehens (Stohr, Milenkovic et al. 2005; Hartzell, Qu et al. 2008). Es sind mehr als 100 Mutationen im *BEST1* Gen bekannt. Sie kommen gehäuft in bestimmten Regionen des Proteins vor, wie im Bereich der Aminosäure 300 oder den Transmembrandomänen 2 und 5 am N-Terminus (Milenkovic, Rohrl et al.; White, Marquardt et al. 2000; Boon, Klevering et al. 2009). Der cytoplasmatische C-Terminus weist hingegen die wenigsten Mutationen auf (Abb.1.4).

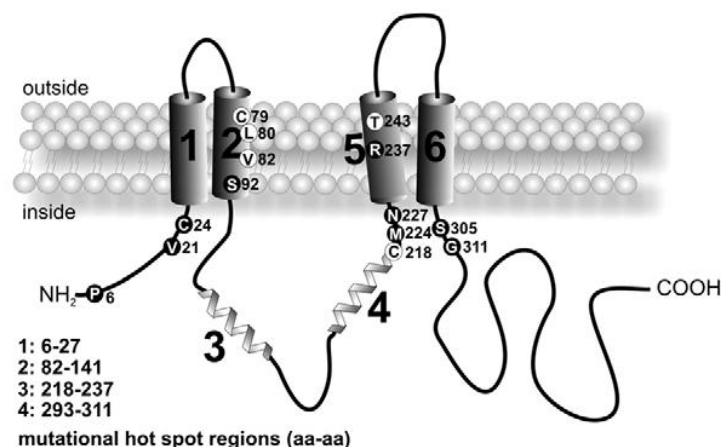


Abbildung 1.4: Model zur Membrantopologie von Bestrophin-1 und relative Lokalisation von krankheitsassoziierten Mutationen. Markierung der 4 „Hotspot“ Regionen im Protein, die besonders viele Mutationen aufweisen (Milenkovic, Rohrl et al. 2011).

Welche Effekte das mutante Bestrophin-1 im RPE auslöst ist bisher nicht geklärt, und der Krankheitsmechanismus daher noch nicht im Detail verstanden. In Überexpressionsstudien in HEK 293 Zellen erreichen verschiedene Mutanten die Plasmamembran, und zeigen defekte Cl⁻ Leitfähigkeit (Yu, Qu et al. 2007). In einer anderen Arbeit in polarisierten MDCK II Zellen zeigen mutante Bestrophine Funktionsverlust, der durch Defizite im Transport zur Zellmembran, sowie einer reduzierten Anionenleitfähigkeit hervorgerufen wird. Während wildtyp Proteine die Membran erreichen, verbleiben Mutanten im Zytoplasma. (Milenkovic, Rohrl et al. 2011). Eine knock-in Mauslinie mit der W93C Mutation weist mit vermehrter Lipofuszinakkumulation, Ablösung der Retina und Veränderungen im LP einen Phänotyp auf, der Leitsymptome der Erkrankung im Menschen beinhaltet (Zhang, Stanton et al. 2010). Sie scheint somit ein interessantes Modell zur Untersuchung des Krankheitsmechanismus darzustellen. Dabei sich in isolierten RPE Zellen keine reduzierte Cl⁻ Leitfähigkeit zeigen, vielmehr können hier Veränderungen ATP induzierter Ca²⁺ Signale beobachtet werden.

1.4. Bestrophin-1

Die Familie der Bestrophine stellt eine Gruppe hochkonservierter Proteine dar (Milenkovic, Langmann et al. 2008). Das humane Genom beinhaltet 4 Bestrophine (*hBEST1*, -2, -3, -4), in der Maus beispielsweise sind 3 und ein Pseudogen bekannt (Tsunenari, Sun et al. 2003; Hartzell, Qu et al. 2008). Bestrophin-1 ist ein 585 Aa großes Protein, dessen Transkripte in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Rückenmark, Herz, Lunge, Leber, Niere, Darm, Muskulatur, Testis und RPE gefunden wurde (Marquardt, Stohr et al. 1998; Petrukhin, Koisti et al. 1998; Stohr, Marquardt et al. 2002; Kramer, Stohr et al. 2004; Park, Oh et al. 2009). Die Proteinexpression humanem Bestrophin-1 wurde hauptsächlich basolateral im RPE nachgewiesen (Marmorstein, Marmorstein et al. 2000; Neussert, Muller et al. 2010). Weiterhin wurde Bestrophin-1 Protein in humanen Atemwegsepithelzellen, und murines Bestrophin-1 in Darmepithelzellen gefunden (Barro Soria, Spitzner et al. 2009). Zur Struktur von Bestrophin-1 gibt es zwei unterschiedliche Modelle. Tsunenari et al. beschreiben 6 hydrophobe Domänen im Bestrophin-1 Protein (Tsunenari, Sun et al. 2003). Dabei stellen die Domänen 1, 2, 4, und 6 Transmembrandomänen (TM) dar, die Domänen 3 und 5 dagegen liegen zur

extrazellulären Seite der Membran hingewandt bzw. in einer zytosolischen Schleife. Das von Milenkovic et al. vorgeschlagene Modell dagegen beschreibt die Domänen 1, 2, 5, 6 als TM (Milenkovic, Rivera et al. 2007). Die Domänen 3 und 4 bilden eine intrazelluläre Schleife. Bestrophin-1 stellt einen Ionenkanal dar, der als Dimer vorkommt (Stanton, Goldberg et al. 2006).

Bestrophin-1 wurde anfangs im heterologen Expressionssystem als ein Ca^{2+} abhängiger Cl^- Kanal der Zellmembran identifiziert, und in RPE Zellen seine basolaterale Lokalisation nachgewiesen (Marmorstein, Marmorstein et al. 2000; Sun, Tsunenari et al. 2002; Neussert, Muller et al. 2010). Überexpressionsstudien zeigten, dass HEK 293 Zellen, die mit dem hBestrophin-1 transfiziert wurden, große Cl^- Ströme aufwiesen, welche durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration aktivierbar waren (Sun, Tsunenari et al. 2002). In Überexpression wurde auch der dominant negative Effekt von mutanten Bestrophin-1 beobachtet, der in Koexpression mit dem wildtyp Protein zu reduzierten Membranströmen führte (Sun, Tsunenari et al. 2002; Marchant, Yu et al. 2007; Yu, Qu et al. 2007). Eine andere Studie beschreibt in murinen Tracheazellen, sowohl durch siRNA mBest1 knock-down als auch durch knock-out des Gens, eine reduzierte Cl^- Leitfähigkeit (Barro-Soria, Schreiber et al. 2008).

Diese Erkenntnisse passten gut ins Bild der von Morbus Best Erkrankung, die als Leitsymptom einen verminderten Hellanstieg (LP) im EOG besitzt. Der LP reflektiert das Transmembranpotential der basolateralen Membran des RPE. Es besteht hier die Hypothese, dass durch die Lichtanregung eine „light-peak Substanz“, wahrscheinlich ATP, von den Photorezeptoren freigesetzt wird, und es über Bindung an RPE Rezeptoren zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt. Dieser Ca^{2+} Anstieg führt zur Aktivierung Ca^{2+} abhängiger Cl^- Kanäle. Während der Messung in der Lichtphase steigt also die basolaterale Cl^- Leitfähigkeit an, es kommt zu einer Depolarisation der basolateralen Membran, und das transepitheliale Potential erhöht sich (Hartzell, Qu et al. 2008). Interessanterweise scheint der Ca^{2+} Einstrom über spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle eine Rolle in der Aktivierung basolateraler Cl^- Leitfähigkeit zu spielen. Die systemische Gabe von Dihydropyridinen (DHP) führt zu Veränderungen des „Lichtanstiegs“ (LP) im DC-ERG, einem Signal das vom RPE generiert wird, in Ratten und Mäusen (Marmorstein, Wu et al. 2006). Auch im Menschen wurde gezeigt, dass L-Typ Ca^{2+} Kanäle am Lichtanstieg beteiligt sind (Constable 2011).

$\text{Ca}_v1.3$ -/- knock-out Mäuse zeigen den signifikant verkleinerten LP (Marmorstein, Wu et al. 2006; Wu, Marmorstein et al. 2007). Danach generiert Bestrophin-1 nicht selbst den LP, sondern reguliert die Aktivität spannungabhängiger L-Typ Ca^{2+} Kanäle (Marmorstein, Wu et al. 2006; Rosenthal, Bakall et al. 2006). Bestrophin-1 interagiert mit $\text{Ca}_v1.3$ direkt über Prolin reiche Domänen mit den SH3 Bindedomänen in der $\beta 4$ Untereinheit der Ca_v Kanäle (Yu, Xiao et al. 2008). Bestrophin-1 verändert dabei die Kinetik der Ströme und die spannungsabhängige Aktivierung von L-Typ Kanälen in elektrophysiologischen Untersuchungen (Milenkovic, Krejcova et al.; Reichhart, Milenkovic et al. 2010).

Es gibt nur wenige Funktionsuntersuchungen endogen exprimierten Bestrophin-1 Proteins. RPE Zellen von *Best1*-/- Mäusen weisen dabei normale Cl^- Leitfähigkeit auf, und der „Lichtanstieg“ im DC-Elektroretinogramm, einem Signal das vom RPE generiert wird, ist im *Best1*-/- Mausmodell nicht verringert (Marmorstein, Wu et al. 2006). Weiterhin weisen *Best1*-/- RPE Zellen im Vergleich zu den wildtypen einen höheren Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach ATP Stimulation auf (Marmorstein, Wu et al. 2006). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass *Best1*-/- RPE Zellen höhere basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufweisen, und auch die Kinetik der Ca^{2+} Freisetzung verändert ist (Neussert, Muller et al. 2010). Weiterhin war porcines Bestrophin-1 nach differentieller Zentrifugation in Fraktionen angereichert, wo auch andere Proteine intrazellulärer Membranen wie CLC-3 und Myosin-7A vorkamen, was Hinweise auf eine intrazelluläre Lokalisation gibt (Neussert, Muller et al. 2010). Übereinstimmend berichtet eine andere Arbeit von der Ko-Lokalisation überexprimierten Bestrophin-1 Proteins mit Stim-1, einem Protein der ER Ca^{2+} Speicher (Barro-Soria, Aldehni et al. 2009). Dies weist auf eine Rolle von Bestrophin-1 im ER bei der Aufnahme oder Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern hin. Hier könnte es als Ca^{2+} abhängiger Cl^- Kanal Gegenionen zum Ladungsausgleich für die Aufnahme/ Abgabe von Ca^{2+} in/aus zytosolischen Speichern transportieren.

Übertragen auf den Krankheitsmechanismus antagonisiert Bestrophin-1 die Entstehung des LP. Über die Regulation spannungsabhängiger Ca^{2+} Kanäle beeinflusst Bestrophin-1 Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und reguliert damit auch die Ca^{2+} abhängige Aktivierung von basalen Cl^- Kanälen. Andererseits könnte die über IP_3 stimulierte Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern, als wichtiger Signalweg in der Phagozytose beeinträchtigt sein. Durch Defizite in der Beladung von ER Ca^{2+}

Speichern, oder der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER könnte die Phagozytosefunktion durch mutantes Bestrophin-1 Protein defizient sein. Lipofuszin Akkumulationen, wie sie für Morbus Best typisch sind, können durch Beeinträchtigungen der Phagozytosefunktion des RPE entstehen.

1.5 Ca^{2+} und Zellfunktionen des RPE

Ca^{2+} Ionen haben eine hohe Affinität für Proteine, und können über Konformationsänderungen Proteinfunktion modulieren (Carafoli 2005). Im RPE werden Zellfunktionen wie Sekretion, transepithelialer Transport von Wasser und Ionen, Differenzierung, Genexpression und Phagozytose durch Anstiege der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert (Hall, Prieto et al. 2001; Hall, Obin et al. 2005; Wimmers, Karl et al. 2007; Karl, Kroeger et al. 2008). Ca^{2+} kontrolliert diese Funktionen entweder direkt oder als sekundärer Botenstoff in einem intrazellulären Signalweg, der durch extrazelluläre Stimuli an der Zelle aktiviert wurde (Berridge 1997; Berridge, Lipp et al. 2000; Berridge, Bootman et al. 2003). Kleine Veränderungen in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lösen starke Variationen in der Zellfunktion aus. Die Zelle ist generell bestrebt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sehr gering zu halten und verfügt über verschiedene Mechanismen um die Konzentration freier Ca^{2+} Ionen im Zytosol zu kontrollieren (Berridge, Lipp et al. 2000). $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher und Ca^{2+} -ATPase der Zellmembran transportieren Ca^{2+} aktiv aus dem Zytosol (Wimmers, Karl et al. 2007). Die Aufnahme von Ca^{2+} ins ER erfolgt unter Energieverbrauch über SERCA (Berridge, Bootman et al. 2003). RPE Zellen besitzen mit 15mmol/l eine ungewöhnlich hohe Menge an Ca^{2+} (Fishman, Oberc et al. 1977; Salceda and Riesgo-Escovar 1990; Ulshafer, Allen et al. 1990). Neben dem aktiven Transport von Ca^{2+} in Kompartimente wie Mitochondrien, saure Endosomen oder ER besitzt die RPE Zelle Melanosomen, die hohe Mengen an Ca^{2+} aufnehmen können (Berridge, Lipp et al. 2000; Boulton and Dayhaw-Barker 2001).

Zur Generation vielfältiger Ca^{2+} Signale, die der Regulation unterschiedlichster zellulärer Prozesse dienen, besitzt die Zelle die Möglichkeit Ca^{2+} aus internen Speichern zu rekrutieren, oder über die Zellmembran einströmendes Ca^{2+} zu nutzen (Berridge 2005). Die Ca^{2+} Freisetzung aus ER Speichern, ebenso wie aus Melanosomen, erfolgt durch Stimulierung von IP_3 -Rezeptoren und Ryanodin-Rezeptoren. Die Spezifität der Ca^{2+} Signale entsteht durch Unterschiede in

Amplitude, sowie räumlicher und zeitabhängiger Verteilung der Signale in der Zelle. In Abhängigkeit von der Stärke der extrazellulären Stimulation kann die Amplitude des Ca^{2+} Signals durch Öffnung unterschiedlich vieler Rezeptoren des ER variieren (Lipp and Niggli 1998). Eine geringe Stimulation durch Agonisten führt zur Öffnung einiger einzelner IP_3 / RYR-Rezeptoren, wobei „quarks“ oder „blips“ detektiert werden (Bootman, Niggli et al. 1997; Lipp and Bootman 1997). Stärkere extrazelluläre Stimuli führen zur Öffnung kleiner Gruppen (10-20) von Rezeptoren, und es entstehen Ca^{2+} Signale, die „puffs“ oder „sparks“ genannt werden (Cheng, Lederer et al. 1993). Diese sehr starken lokale Ereignisse wandeln sich durch Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung, die Aktivierung benachbarter Rezeptoren, in eine Ca^{2+} Welle um, die sich global auf die Zelle erstreckt (Robb-Gaspers and Thomas 1995). RPE Zellen sind über gap junctions miteinander verbunden, und so können sich Ca^{2+} Signale zwischen den Zellen ausbreiten. Ca^{2+} Signale treten oft als regelmäßige Oszillationen auf, deren Frequenz die Konzentration des externen Signals widerspiegelt (Berridge 1997).

1.6 Ca^{2+} Kanäle des RPE

In RPE Zellen kommen verschiedene Typen von Ca^{2+} Kanälen vor, die sich in die Gruppen der spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanäle, TRP Kanäle und liganden-aktivierten Ca^{2+} leitenden, nicht selektiven Kationen Kanäle unterteilen lassen (Wimmers, Karl et al. 2007).

1.6.1 Spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle

Spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle sind hoch spezifisch Ca^{2+} Ionen leitende Kanäle, die hauptsächlich durch Depolarisation der Zellmembran aktiviert werden (Striessnig 1999; Striessnig, Hoda et al. 2004). Die 10 Vertreter werden aufgrund ihrer Eigenschaften in 3 Untergruppen: L-Typ- ($\text{Ca}_v1.1-1.4$), N, P/Q, R-Typ ($\text{Ca}_v2.1-2.3$) und T-Typ ($\text{Ca}_v3.1-3.3$) Kanäle, unterteilt (Catterall 1998). Alle Familien zeigen den gleichen Aufbau bestehend aus $\alpha 1$ -Untereinheit, der Kanalpore, β -Untereinheit, modifiziert die Kanalaktivität, Pharmakologie und beeinflusst den Transport des Kanals zur Membran, und zusätzlichen $\alpha 2\delta$ und γ Untereinheiten.

Im RPE sind verschiedene L-Typ und T-Typ Kanäle vorhanden (Ueda and Steinberg 1993; Strauss and Wienrich 1994; Ueda and Steinberg 1995; Rosenthal and Strauss 2002; Wimmers, Coeppicus et al. 2008). Über die Funktion von T-Typ Kanälen ist nichts bekannt. Der Ca^{2+} Einstrom über L-Typ Ca^{2+} Kanäle $\alpha_1\text{D}$ spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen wie Phagozytose oder Sekretion von Wachstumsfaktoren (Rosenthal, Malek et al. 2005; Rosenthal, Heimann et al. 2007; Karl, Kroeger et al. 2008). Die spezifische Blockade von L-Typ Kanälen führt zu einem signifikant verkleinerten „Lichtanstieg“ im Elektroretinogramm von Mäusen und Ratten, was eine Beteiligung dieser Kanäle an der lichtinduzierten Antwort des RPE zeigt (Marmorstein, Wu et al. 2006; Rosenthal, Bakall et al. 2006). Expressionsanalysen der porenbildenden α_1 -Untereinheiten bestätigten das Vorliegen der Transkripte für $\text{Ca}_v1.1$, 1.2 , 1.3 , $\text{Ca}_v3.1$ und $\text{Ca}_v3.3$ durch RT-PCR in ARPE19 Zellen und primären humanen RPE Zellen, sowie das Vorhandensein der L-Typ Kanalproteine $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ (Wimmers, Coeppicus et al. 2008). In elektrophysiologischen Analysen von RPE Zellen verschiedener Spezies konnte gezeigt werden, dass die einzigen funktionell aktiven Mitglieder, die der L-Typ Familie im RPE sind (Strauss, Buss et al. 2000; Wollmann, Lenzner et al. 2006). Vorallem $\text{Ca}_v1.3$ Ströme tragen dominierend zu den whole-cell Strömen bei (Strauss, Mergler et al. 1997).

1.6.2 Orai-1 und SOCE

Über Anstiege der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Speicherentleerung aktivierten Ca^{2+} Einstrom (engl. Store operated Ca^{2+} entry – SOCE) werden viele zelluläre Prozesse kontrolliert, wie beispielsweise Genexpression, Sekretion oder Phagozytose (Clapham 2007; Parekh 2010). Der Mechanismus der SOCE Aktivierung wurde kürzlich aufgeklärt (Parekh and Putney 2005). Die wichtigen molekularen Komponenten sind Proteine der STIM- (stromal interacting molecule) und Orai Familien (Liou, Kim et al. 2005; Prakriya, Feske et al. 2006; Vig, Beck et al. 2006; Vig, Peinelt et al. 2006; Zhang, Yeromin et al. 2006). STIM1, ein Transmembranprotein des ER, was über eine Ca^{2+} Bindedomäne im ER-Lumen verfügt, kommt als Dimer vor. Die Ca^{2+} -Sensoren oligomerisieren nachfolgend an die ER Ca^{2+} -Speicher Entleerung, und Stim-1 Oligomere akkumulieren nun in plasmamembrannahen Regionen. Dort interagiert STIM-1 direkt mit Orai-1 Kanälen und aktiviert sie (Cahalan, Zhang et al. 2007;

Parekh 2010). Die Translokation aktiviert also Orai-1, und ermöglicht einen Einstrom von Ca^{2+} über die Zellmembran (Cahalan 2010).

Über den beschriebenen Mechanismus von SOCE stehen somit die beiden Wege zur Generierung $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Signale in der Zelle, Freisetzung aus intrazellulären Speichern über Aktivierung von IP_3 Rezeptoren, und Ca^{2+} Eintritt über geöffnete Kanäle der Zellmembran, miteinander in Verbindung. Im RPE zeigt bisher eine Studie die Existenz des SOCE Mechanismus. Hier wurden die molekularen Komponenten identifiziert, und funktionell das Vorhandensein von Orai-1 Kanälen bewiesen (Cordeiro and Strauss 2010). In Neutrophilen und Monozyten wurde eine Beteiligung des SOCE Mechanismus an der Generation von Ca^{2+} Signalen während der Phagozytose beschrieben (Rankin, Yocum et al. 1993; Jakus, Simon et al. 2009)

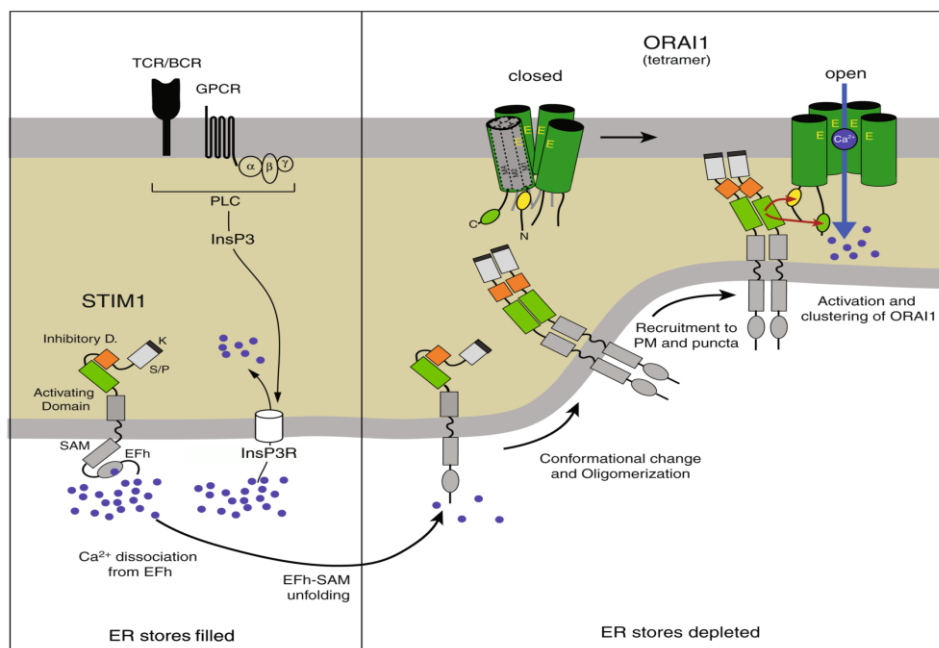


Abbildung 1.6: Durch Speicherentleerung aktivierter Ca^{2+} Einstrom (SOCE). Stim-1 sitzt als Transmembranprotein im ER. Sein N-Terminus ragt ins ER Lumen und die EF-hand Domäne dient als Sensor des ER Ca^{2+} Gehalts. Der C-Terminus von Stim-1 besitzt eine CAD Domäne (CRAC-Activated domain), die mit Orai-1 Kanälen interagiert und diese aktiviert. Orai-1 Kanäle befinden sich in der Plasmamembran, wobei sowohl C- als auch N-Terminus ins Zytosol ragen. Beim Mechanismus der SOCE Aktivierung transloziert Stim-1 nach Entleerung des ER in plasmamembrannähe Bereiche, und aktiviert Orai-1 Ca^{2+} Kanäle der Zellmembran. Diese direkte Interaktion ermöglicht nun den Einstrom extrazellulärem Ca^{2+} (Feske 2010).

1.6.3 TRP Kanäle

TRP Kanäle stellen eine große Gruppe von Ca^{2+} leitenden Kationenkanälen dar. Es werden 6 Hauptgruppen unterschieden: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPML (mucolipin), and TRPP (polycystin). TRP Kanäle sind in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und an verschiedensten physiologischen Prozessen beteiligt. Das Spektrum reicht von sensorischen Funktionen wie Geschmacks- oder Schmerzempfinden, Temperaturgefühl, über homöostatische Funktionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} Reabsorption und Osmoregulation, bis hin zu Bewegungsfunktionen wie Muskelkontraktion und vasomotorische Kontrolle (Nilius and Owsianik 2011). Nachdem sie Ca^{2+} Eintrittswege in die Zelle darstellen, sind sie für eine Vielzahl Ca^{2+} -abhängiger Zellfunktionen wichtig (Gees, Colsoul et al. 2010).

TRP Kanäle können durch eine Vielzahl chemischer oder physikalischer Stimuli aktiviert werden, wie Bindung von Liganden, Temperatur, Veränderungen in Osmolarität oder Zellvolumen, mechanische Reize oder Spannung (Nilius, Owsianik et al. 2007). TRPC und TRPM sind involviert in intrazelluläre Signalkaskaden, nachdem sie durch G Protein Untereinheiten, Metabolite aus Signalkaskaden oder durch Entleerung der zytosolischen Ca^{2+} Speicher aktiviert werden (Wimmers, Karl et al. 2007). TRPV und TRPA werden durch hohe Temperaturen oder pH aktiviert. TRPML ist eine Familie, die in intrazellulären Organellen vorkommt. Der molekulare Aufbau erinnert an spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle mit 6 Transmembransegmenten (S1-S6), intrazellulären N-, C-Termini und einer intrazellulären porenformenden Schleife zwischen S5 und S6. Die Länge der zytosolischen Enden variiert stark zwischen den einzelnen Unterfamilien, genau wie deren strukturelle und funktionelle Domänen (Nilius and Owsianik 2011).

Im RPE wurde die Expression von Mitgliedern der TRPC Familie, TRPC1, 4, 7, beschrieben, die zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials und zum basalen Ca^{2+} Eintritt in die Zelle beitragen (Wimmers and Strauss 2007). Weiterhin wurden die Hitze-induzierbaren Kanäle TRPV 1, 2, 3, 4 in frisch isolierten humanen RPE Zellen und in der ARPE19 Zelllinie identifiziert, wobei hier wohl vor allem TRPV2 Aktivierung in einer dominierenden Rolle zur Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF-A beiträgt (Cordeiro, Seyler et al. 2010).

1.6.4 ATP Rezeptoren

ATP Rezeptoren werden in zwei Gruppen unterteilt. P2X stellen liganden-aktivierte Ionenkanäle dar, die sowohl Na^+ als auch Ca^{2+} Ionen leiten können, wogegen P2Y Rezeptoren G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind, die eine intrazelluläre Signalkaskade mit nachfolgender Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktivieren (North 2002; Burnstock 2004; Wimmers, Karl et al. 2007). ATP abhängige Signalwege spielen eine Rolle in der Regulation des transepithelialen Ionen- und Wassertransports, sowie in der Phagozytose der RPE Zellen (Peterson, Meggyesy et al. 1997; Reigada, Lu et al. 2005; Reigada and Mitchell 2005). Das RPE ist selbst in der Lage nach Stimulation mit bFGF oder durch volumenregulierende Reize, ATP zu sezernieren (Mitchell 2001; Reigada, Lu et al. 2005; Reigada and Mitchell 2005). Das vom RPE sezernierte ATP kann als autokriner Botenstoff an P2Y oder P2X Rezeptoren binden (Mitchell 2001; Reigada, Lu et al. 2005; Reigada and Mitchell 2005).

1.7 K^+ Kanäle des RPE

Eine wichtige Aufgabe des RPE besteht darin, eine konstante Ionenkomposition im Subretinalraum sicherzustellen, und damit die lichtinduzierten Veränderungen der K^+ Konzentration zu kompensieren. Somit kommen eine Vielzahl verschiedener K^+ Kanäle in den Zellen vor. Diese lassen sich in einwärts rektifizierende K^+ Kanäle (Kir), spannungsabhängige K^+ Kanäle, Ca^{2+} -aktivierte K^+ Kanäle und Zwei-Poren K^+ Kanäle unterteilen (Wimmers, Karl et al. 2007).

1.7.1 BK Kanäle

Die Gruppe der BK Kanäle sind spannungs- und Ca^{2+} aktivierbare K^+ Kanäle mit einer sehr großen Einzelkanal-Leitfähigkeit von 200 -300 pS (Wei, Gutman et al. 2005). Der Kanal besteht aus einem Tetramer von α -Untereinheiten ($\text{BK}\alpha$), wobei diese Polypeptide von 125-140 kDa durch ein einziges Gen codiert werden, von dem eine hohe Anzahl an splice-Varianten bekannt ist. Die zelltypspezifische Expression der zusätzlichen β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 4$) kann zu funktionellen Diversitäten führen, indem sie Öffnung, Pharmakologie und Wanderung der $\text{BK}\alpha$ zur Membran beeinflusst (Ghatta, Nimmagadda et al. 2006; Berkefeld, Fakler et al. 2010).

BK Kanäle sind in einem breiten Spektrum von neuronalen und nichtneuronalen Geweben exprimiert. In der Vertebraten Retina sind sie in Photorezeptoren, Bipolar-, Amakrinen-, Ganglion Zellen und dem RPE zu finden (Sakaba, Ishikane et al. 1997; Pelucchi, Grimaldi et al. 2008; Grimes, Li et al. 2009; Berkefeld, Fakler et al. 2010). In zentralen Neuronen und RPE Zellen werden die zur BK Aktivierung benötigten Ca^{2+} Ionen von Ca_v Kanälen zur Verfügung gestellt (Wimmers, Halsband et al. 2008). Die hohen Konzentrationen von $>10\mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ werden nur in unmittelbarer Nähe zur Ca^{2+} Quelle erreicht, was eine enge Kolokalisation von $\text{BK}\alpha$ und Ca_v Kanälen erfordert. BK and Ca_v bilden makromolekulare Komplexe mit einer $\sim 10\text{nm}$ Distanz beider Poren. Nach dieser Hypothese ist ein BK Kanal von mehreren einzelnen L-Typ Kanälen umgeben. Es besteht eine direkte Interaktion zwischen beiden Kanälen (Berkefeld, Fakler et al. 2010). Je nach Interaktionspartner kann BK entweder einen Rückkopplungsinhibitor für den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Interaktion mit L-Typ Kanälen darstellen (Feletou 2009). In der Interaktion mit TRP Kanälen dagegen führt die BK Aktivität zu einer positiven Rückkopplung, und erhöht die Triebkraft für einen Ca^{2+} Einstrom. BK Kanäle sind in eine ganze Reihe von physiologischen Prozessen involviert. Im RPE spielen sie eine Rolle in der Volumenregulation der Zellen. So führte hypoosmotischer Stress zu einem Anstieg der BK Ströme (Sheu, Wu et al. 2004).

1.8 Zielsetzung

Zapfen und Stäbchen regenerieren täglich ihre Außensegmente, wobei die ältesten distalen Enden durch das benachbarte RPE phagozytiert werden. Störungen dieser Interaktion werden in vererbten retinalen Erkrankungen und der altersbedingten Makuladegeneration beobachtet.

Die Phagozytose ist ein Ca^{2+} abhängiger Prozess. Nachdem sehr wenig über für die Phagozytosefunktion relevanten Ca^{2+} Signalwege im RPE bekannt ist, besteht das Thema der vorliegenden Arbeit darin, die Rolle von Ionenkanälen in der Regulation des Prozesses zu untersuchen. Dazu ist die Arbeit in zwei Teile gegliedert:

- Im Zellkultursystem primärer porciner RPE Zellen wird in vitro der regulatorische Einfluss verschiedenener Ionenkanälen auf die Phagozytosefunktion der Zellen, unter Verwendung pharmakologischer Ionenkanalmodulatoren und siRNA knock-down, getestet.
- Im Tiermodell von BK^{-/-} und Ca_v1.3^{-/-} defizienten Mäusen wird in vivo der Einfluss zweier Kandidaten auf den zirkadian regulierten Prozess der Phagozytose in retinalen Gewebeschnitten untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) bezogen. Kunststoffverbrauchsartikel wurden von Corning, bzw. Zellkulturplatten und Zellfilter von Costar (Corning Incorporated, USA), bestellt.

| Antikörper | |
|---|--|
| Anti-Ca _v 1.3 | rb, polyklonal, ACC-005, Alomone Labs, Israel |
| Anti-BK ₍₆₇₄₋₁₁₁₅₎ | rb, polyklonal, AG Prof. P. Ruth, Uni Tübingen (Sausbier, et al. 2006) |
| Anti-β-Catenin | ms, monoklonal, 610153, BD |
| Anti-Bestrophin | ms, monoklonal, ab2182, Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-β-Actin | ms, monoklonal, ab6276, Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-Orai-1 | rb, polyklonal, Alomone Labs, Israel |
| Anti-Rhodopsin | ms, monoklonal 1D4, Molday (Molday, et al. 1983) |
| Ziege-anti-Maus IgG, Alexa Fluor 546 | Molecular Probes, Invitrogen |
| Ziege-anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488 | Molecular Probes, Invitrogen |
| anti-Kaninchen oder anti-Maus IgG HRP-gekoppelt | NEB, Frankfurt |

Tab. 2.1: Antikörper

2.2 Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller/ Modell |
|-----------|--------------------|
| Allgemein | |
| Waage | BP 1200, Satorius |

| | |
|-------------------------|--|
| pH. Meter | Mettler Toledo |
| Photometer | Nanodrop 2000, Thermo Scientific |
| Pipetten | Reference, Eppendorf AG |
| Mikroplatereader | Varioskan Flash, Thermo Scientific |
| Zentrifuge | Megafuge1.0, Heraeus |
| Zentrifuge | Minispin, Eppendorf |
| Zentrifuge | Mikro 220 R, Hettich |
| Ultrazentrifuge | Beckman XL80 Ultrazentrifuge |
| Mikroskop | Olympus CK2 |
| Mikroskop | Fluoreszenzmikroskop, Observer.Z1, Zeiss, VisiChrome polychromatic illumination system, Visitron Systems, Software MetaMorph |
| Mikroskop | Konfokales Laser Scanning Mikroskop, Observer Z1; LSM 710; Carl Zeiss, Software ZEN 2008 |
| Zellkultur | |
| Präparationsmikroskop | Carl Zeiss Universal S3 |
| Inkubator | Hera cell 150 (Thermo scientific) |
| Sterile Werkbank | Hera Safe (Thermo scientific) |
| Histologie | |
| Inkubator | Memmert, Labor Center |
| Gewebeeinbettautomat | Hypercenter XP, Shandon |
| Kühlplatte | EG1150, Leica |
| Microtom | Jung RM 2055, Leica |
| Molekularbiologie | |
| Thermocycler | Opticon Eclipse Realtime Cyclers, MJ Research, USA |
| Geldokumentationssystem | Fluorchem FC2, Alpha Innotech |

Tab. 2.2: Geräte

2.3 Mauslinien

Für die Versuche wurden aus der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Ruth (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) BK Kanal defiziente Mäuse (BK^{-/-}) und wildtyp Mäuse (BK^{+/+}) (Sausbier, Hu et al. 2004) mit einem SV129/C57BL6 Hintergrund zur Verfügung gestellt, und Nachkommen eines Wurfes für die Experimente benutzt.

Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jörg Striessnig (Institut für Pharmazie, Universität Innsbruck) wurden Ca_v1.3 ^{+/+} wildtyp und Ca_v1.3^{-/-} knock-out Mäuse, die für mindesten 5 Generationen auf einen C57BL/6N Hintergrund rückgekreuzt waren, zur Verfügung gestellt (Platzer, Engel et al. 2000).

Eine in der Arbeitsgruppe von Alan D. Marmorstein (Optical SciencesCenter, University of Arizona, USA) generierte *Best1*^{-/-} Maus mit C57BL/6 Hintergrund wurde durch die Gruppe von Prof. Kunzelmann (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt (Marmorstein, Wu et al. 2006).

Die Versuchstiere wurden im Tierstall in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h gehalten. Im entsprechenden Alter wurden Tier mit CO₂ getötet. Sofort nach Eintritt des Todes wurden die Augen der Tiere enukleiert.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Gewinnung und Kultur primärer muriner RPE Zellen

Die Schweineaugen (5-7h nach Schlachtung) wurden entlang der *Ora serrata* geöffnet, und der Glaskörper entfernt. Die Augenbecher wurden mit vorgewärmten PBS-EDTA (1mM) für ca. 1 Stunde bei RT inkubiert, bis sich die Retina ablöste und leicht entfernen ließ. Danach erfolgte nochmals eine 30 minütige Inkubation der Augenbecher mit PBS-EDTA, die von einer Inkubation in Enzymlösung PBS-EDTA mit L-Cys (260 mM), BSA (100mg/ml) und Papain (1µl/ml, Worthington) für 23 min bei 37°C gefolgt wurde. Die RPE Zellen wurden durch mehrmaliges kräftiges Spülen der Augenbecher und Auf- und Abpipettieren mit Kulturmedium (500 ml Hams F12/DMEM (mit Glutamin) (PAA: E15-813), 10 % FKS (PAA), 1 % Pen-Strep. (PAA: P11-010), 250 µl Insulin/Transferrin, 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 2,5 ml 1 M

HEPES geerntet, und die Papainaktivität gestoppt. Nach einem Waschschrift wurden jeweils die aus 1,5 Augen gewonnen Zellen in 100µl frischem Medium in einer 12-Well Zellkulturplatte ausgesäht. Am nächsten Tag wurde 1ml Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wuchsen für 1-2 Wochen bis zum Experiment bei 37°C und 5%CO₂.

2.4.2 Gewinnung und Kultur primärer porciner RPE Zellen

Die frischen Schweineaugen wurden entlang der *Ora serrata* geöffnet, und der Glaskörper entfernt. Die Augenbecher wurden mit vorgewärmten PBS-EDTA (1mM) für ca. 1 Stunde bei RT inkubiert, bis sich die Retina ablöste und leicht entfernen ließ. Danach erfolgte nochmals eine 30 minütige Inkubation der Augenbecher mit PBS-EDTA, die von einer Inkubation in Enzymlösung PBS-EDTA mit L-Cys (260 mM), BSA (100mg/ml) und Papain (1µl/ml, Worthington) für 23 min bei 37°C. Die RPE Zellen wurden durch mehrmaliges kräftiges Spülen der Augenbecher und Auf- und Abpipettieren mit Kulturmedium (500 ml MEM α modif. (Sigma M-4526), 10% FKS Gold (PAA), 5 ml glut-pen-strep. (Sigma G-1146), 5 ml N1-Supplement (Sigma N-6530), 5 ml nichtessentielle Aminosäuren, THT (Hydrocortisone (20µg/L), Taurine (250 mg/L), and Triiodo-thyronin (0.013 µg/L) abgelöst. Nach einem Waschschrift (3min, 800g) wurden die gewonnen Zellen in einer Dichte von 1-1,2 x 10⁶ Zellen/ml in 50µl Medium pro Loch einer 96-Well-Platte ausgesäht. Am nächsten Tag wurden pro Well der Zellkulturplatten noch weitere 50µl Medium (5% FKS) aufgefüllt und bis zum Experiment unter diesen Bedingungen und 37°C and 5%CO₂ kultiviert.

2.5 siRNA Transfektion der primären porcinen RPE Zellen

25-Nukleotid siRNA Moleküle wurden von Invitrogen (Paisley, UK) synthetisiert. Sowohl unspezifische Kontroll siRNA als auch spezifische siRNA waren mit Alexa 488 gekoppelt, was eine Kontrolle der Transfektion ermöglichte. Im letzten Schritt der Zellisolierung wurden die Zellen in einer Mischung aus normalem Kulturmedium (50%) und Optimem I Medium (GIBCO) (50%) resuspendiert, was das Transfektionsreagenz (Lipofectamin, Invitrogen, 6µl ad 300µl Medium) und siRNA

(9µl, 20µM) enthielt, und so ausplattiert. Orai-1 siRNA und Bestrophin-1 siRNA wurden je als Mischung von 3 verschiedenen RNAi Molekülen verwendet (Tab.2.3). Am nächsten Tag wurde Medium (5% FKS) aufgefüllt.

| Gene | siRNA sequence | Position |
|-------|--------------------------------------|----------|
| BEST1 | Sense: CCACACAACUCAUUCUGGAUGCCCU | 72 |
| | Antisense: AGGGCAUCCAGAAUGAGUUGUGUGG | |
| | Sense: CCCUCUUCACGUUCCUGCAGUUCUU | 364 |
| | Antisense: AAGAACUGCAGGAACGUGAAGAGGG | |
| | Sense: CCCAUGGAGCGAGAUUAUGUACUGGA | 534 |
| | Antisense: UCCAGUACAUAUCUCGCUCCAUGGG | |
| ORAI1 | Sense: CGGUGAGCAAUGUGCACAACCUCAA | 470 |
| | Antisense: UUGAGGUUGUGCACAUUGCUCACCG | |
| | Sense: CCUUUGGCCUGAUCUUUAUCGUCUU | 764 |
| | Antisense: AAGACGAUAAAGAUCAGGCCAAAGG | |
| | Sense: GGGCACUUCAGAGCUUUGGCCUUA | 950 |
| | Antisense: UUAAGGCCAAAGCUCUGAAGUGCCC | |

Tab. 2.3: RNAi Moleküle. Sequenzen der verwendeten siRNA Moleküle zum knock-down von Bestrophin-1 und Orai-1.

2.6 Isolierung von Photorezeptoraußensegmenten (OS)

Porcine retinale Photorezeptoraußensegmente (OS) wurden mittels Homogenisation und anschließender Dichtegradientenultrazentrifugation isoliert. Die Analyse durch Lichtmikroskopie und Western Blot dienten der Identifikation der erfolgreichen OS Isolierung.

2.6.1 Präparation der Retinae

Retinae wurden aus frischen Schweineaugen entnommen. Die Bulbi wurden vom Muskelgewebe entfernt. Mit einem Skalpelli wurde im korneoskleralen Übergang ein Schnitt gesetzt und von dort aus mit einer gebogenen Augenschere zirkulär unterhalb der *Ora serrata* umschnitten. Die Kornea mitsamt Ziliarkörper wurde verworfen. Die Retina wurde mit einer Pinzette unterhalb der Papille aufgenommen und mittels einer Schere abgetrennt. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C. 80 Retinae entsprachen ungefähr 20 ml und wurden für einen Durchlauf des Isolierungsverfahrens verwendet. Die Retinae wurden langsam bei 25 °C aufgetaut.

2.6.2 Homogenisation und Dichtegradientenultrazentrifugation

Die Retinae wurden mit 2ml der 20%igen Sucroslösung versetzt und in einer Zellkulturschale 1min auf einem Schüttler vorsichtig bewegt. Auf diese Weise werden die OS mechanisch am Innensegment des Photorezeptors abgetrennt. Danach erfolgte eine grobe Filtration über eine sterile Kompresse, große Gewebestücke wurden somit entfernt. Eine Tablette Roche Complete™ zur Proteaseinhibition wurde in 1 ml PBS gelöst und 100µl pro Zentrifugenröhrchen zu den Retinae hinzugegeben, um unspezifischen Proteinverdau zu limitieren.

In 4 Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Polyallomer, 38,6 ml Fassungsvermögen) wurde ein kontinuierlicher Sucrosedichtegradient aus 20% und 60% Sucrosegredientenlösung (130mM NaCl, 20mM Tris, 10mM Glucose, 5mM Taurin, 2mM MgCl₂, 20% bzw. 60% (w/v) Sucrose, pH 7,2, sterilfiltriert) je 16ml erstellt. Dazu wurde ein Gradientenmischer verwendet. Vom Homogenat wurden vorsichtig 5 ml auf jeden Gradienten pipettiert. In einer Beckman XL80 Ultrazentrifuge (Beckman für Rotor SW31 Ti) wurde für 45 min bei 25 700 rpm (141'371 g) zentrifugiert. Es wurde keine Bremsfunktion verwendet. Nach der Zentrifugation fanden sich mehrere weiße Banden im Zentrifugenröhrchen. Die obere Bande enthält OS, und wurde durch seitliches Anstechen des Röhrchens mittels einer feinen Kanüle, und abziehen der Bande in eine 2 ml Spritze aufgenommen.

In einem weiteren Waschschrift wurde das Filtrat 1:5 mit einem 0.02 M Tris-Puffer, pH 7.2 verdünnt. Aufgeteilt auf 6 Zentrifugenröhrchen (Beckman Polyallomer, 13,5 ml Fassungsvermögen) wurde die OS in der Beckman XL80 Ultrazentrifuge (Rotor

SW40 Ti) bei 8 550 rpm (13'000 g) für 10 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das OS Pellet in 25 ml OS Einfrierlösung (2,5% Sucrose, 100mM NaCl, 10mM Phosphatpuffer Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 pH 7,2, sterilfiltriert) resuspendiert. Lichtmikroskopisch wurde in einer Neubauer Zählkammer die Konzentration an OS ermittelt. Portionen von 100 – 300µl der OS Suspension wurden bis zum Experiment bei -80 °C gelagert.

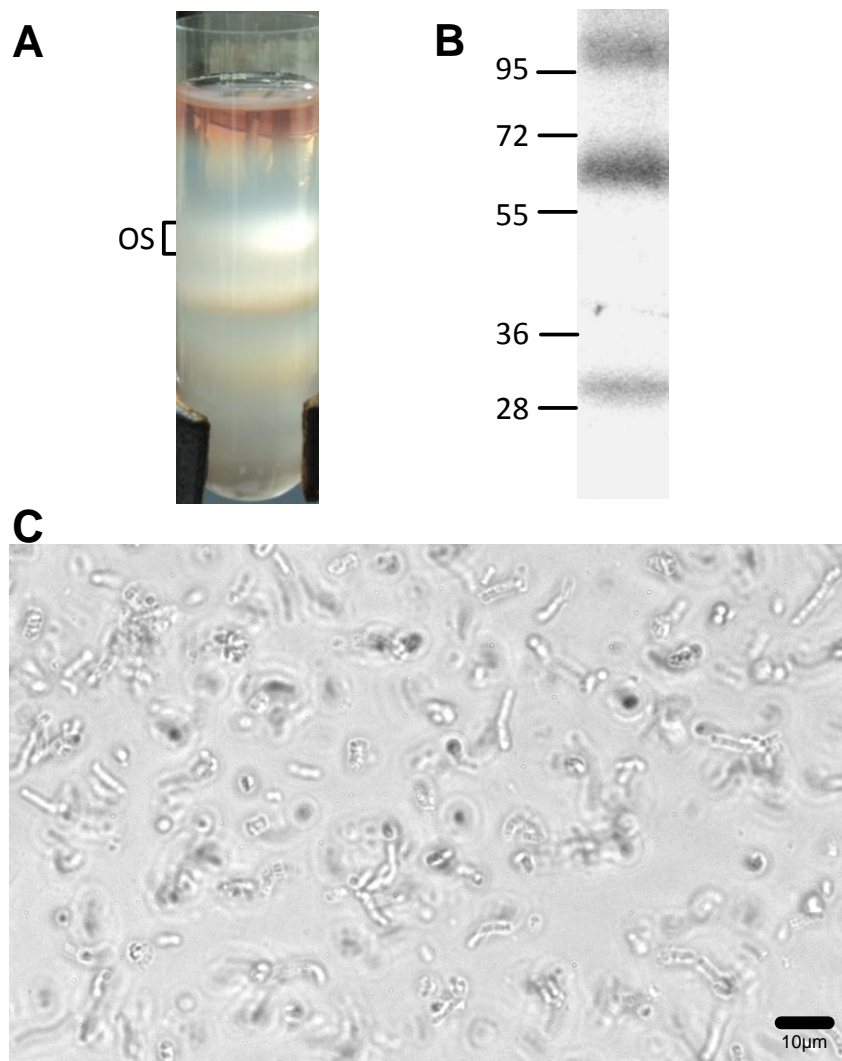


Abbildung 2.1: Präparation von OS. A Sucrosegradient zur Aufreinigung von OS nach Beendigung der Zentrifugation. Die mit OS gekennzeichnete Bande enthält die OS. B Western Blot zur Identifikation von Rhodopsin in der aufgereinigten OS Fraktion. Der primäre anti-Rhodopsin Antikörper erkennt Monomere, Dimere und Trimere des Rhodopsinproteins. C Lichtmikroskopische Aufnahme der aufgereinigten OS.

2.7 Messung der Phagozytose porciner RPE Zellen

2.7.1 Fluoreszenzmarkierung der OS

Die benötigte Menge der bei -80°C gelagerten OS wurde aufgetaut und pelletiert ($10'000\text{ g}$, 3 min , 4°C). Für die Färbung von 1×10^8 OS wurden diese in $300\text{ }\mu\text{l}$ eines $0,2\text{ M}$ Bicarbonatpuffers ($\text{pH } 8,3$) resuspendiert. $15\text{ }\mu\text{l}$ des Fluoreszenzfarbstoffes TAMRA (10 mg/ml in DMSO, Invitrogen) wurden unter vortexen zugegeben, und der Ansatz auf dem Schüttler (Eppendorf) inkubiert (1 Stunde , 4°C , lichtgeschützt). Anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit Bicarbonatpuffer ($10'000\text{ g}$, 5 min , 4°C). Nun wurden die OS in Kulturmedium der porcinen RPE Zellen aufgenommen.

2.7.2 Phagozytose in vitro Assay

5×10^6 OS wurden in $100\text{ }\mu\text{l}$ Medium pro Well einer 96-Well-Platte, die sich für Fluoreszenzmessungen eignet, eingesetzt. Direkt vor Zugabe der OS zu den RPE Zellen wurden entsprechende Mengen an Pharmaka zugegeben ((-)-BayK 8644, (+)-BayK 8644, Paxillin, Ruthenium Rot, 2-APB (Tocris)). Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit im Brutschrank erfolgten 5 stringente Waschschrte mit Ringerlösung (130 mM NaCl , 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES , 5 mM Glucose , 5 mM KCl , $\text{pH } 7,2$) unter Schütteln. Die Menge an phagozytierten OS konnten nun im Microplatereader anhand der gemessenen Fluoreszenz bei einer Extinktion von 555 nm und einer Emission von $580 \pm 12\text{ nm}$ ermittelt werden.

2.8 Subzelluläre Fraktionierung

Mit Hilfe von differentieller Zentrifugation wurde eine subzelluläre Fraktionierung von RPE Zellen frischer porciner Augen durchgeführt. Wie unten schematisch dargestellt, wurden in mehreren Zentrifugationsschritten Membranfraktionen und subzelluläre Fraktionen aus RPE Zellen gewonnen (Devuyst, Christie et al. 1999).

Dazu wurden im ersten Schritt RPE Zellen mit einem Douncer in kaltem Puffer (300 mM Saccharose , 25 mM HEPES , $\text{pH } 7,0$ mit 1 M Tris , Proteaseinhibitor Roche complete) homogenisiert. Das RPE Homogenate wurde zentrifugiert bei 2000 g , 3 min , 4°C . Das entstandene Pellet beinhaltet unlysierte Zellen sowie Zellkerne, und

wurde verworfen. Der entstandene Überstand wurde erneut zentrifugiert (19 000g, 20min, 4°C). Das initiale Pellet wurde resuspendiert, eine 1,12 M Saccharose Lösung damit überschichtet und es folgte der nächste Zentrifugationsschritt (100 000g, 60min, 4°C). Das entstandene Pellet beinhaltete Zellkerne und Mitochondrien. Die Interphase wurde weiter zentrifugiert, um schließlich die Plasmamembranfraktion zu erhalten (PM) (40 000g, 20min, 4°C).

Zwei weitere subzelluläre Fraktionen wurden durch Zentrifugation des initialen Überstandes gesammelt: ein Low-speed pellet (LSP) (41 000g, 20min, 4°C) mit dem dazugehörigen Überstand, und ein high-speed pellet (HSP) (160 000g, 75min, 4°C) aus dem low-speed supernatant (LSS) mit dem dazugehörigen Überstand (HSS). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford protein assay bestimmt, ein BSA Standard wurde verwendet. Alle Proteinlösungen wurden bei -80°C gelagert.

2.9 Western Blot

Proteinextrakte von RPE Zellen wurden durch Gelelektrophorese auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran durch 1 stündige Inkubation in 5%igen Magermilch-PBS (0.05% Tween 20) bei RT erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern anti-Bestrophin-1(1:3000), anti-Orai-1 (1:300), anti-β-Aktin (1:5000) und anti-Rhodopsin (1:1000) verdünnt in PBS/Tween und 0.05% Magermilch ü.N. bei 4°C. Nach mehreren Waschschritten (3x 10min) mit PBS/Tween (0.05% Tween 20) wurde die Membran für 1 Stunde mit einem enzymgekoppelten (HRP) sekundären Antikörper anti-rb oder anti-ms IgG (1:5000) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten (3x 10min) erfolgte die Färbung der Membran mit dem entsprechenden Substrat durch ein Chemilumineszenzsignal (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany).

2.10 RealTime PCR

RPE Zellen wurden geerntet und lysiert. Die Gesamt RNA der RPE Zellen wurde isoliert unter Verwendung des NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland). Die RNA (1µg) wurde revers transkribiert in cDNA unter Verwendung

des I-Script cDNA Synthese Kit (BioRad, München, Deutschland). Zur Quantifizierung wurde der SYBRgreen basierte 2x SSO Fast EvaGreen Kit (BioRad) genutzt. Quantitative-PCR Experimente wurden durchgeführt unter Verwendung eines MJ Research Opticon Eclipse Real-Time Cyclers (BioRad). Die PCR Reaktionen wurden im 20 µl Reaktionensvolumen mit 5 µl 1:5 verdünnter cDNA in 45 Zyklen (30 s 94°C, 30 s 59°C, 30 s 72°C), und 1.5 pmol vorwärts und rückwärts Primer spezifisch für verschiedene im RPE exprimierte P2Y Rezeptoren (Tabelle 2.4) durchgeführt. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt. β -Aktin wurde als Housekeeper zur Normalisierung benutzt.

| Primer | Sequenz |
|--------|---|
| mP2Y1 | F: TGGCGTGGTGTACCCTCTCAAGTC R: ACCGTGCTCGCAAATTCATCGTT |
| mP2Y2 | F: ACCAGCGTGCGGGGAACC R: GCATCTCGGGCAAAGCGGACAAGT |
| mP2Y4 | F: TGCCTCGTGCCCAACCTCTTCTTT R: CAGTTGTTTCGGCGCTTAGGTGTGC |
| mP2Y6 | F: CCTGGCACTGGCGGACCTGAT R: GGCGGGCCATACTGG |

Tab. 2.4: Oligonukleotide. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide in 5'-3' Orientierung sind angegeben.

2.11 Messung des transepithelialen Widerstandes

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) porciner RPE Zellen wurde mit einem Evom² Epithelialen Voltohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, USA) gemessen. Die Zellen wurden auf Transwell Filtern (0.4 mm Porengröße) mit Polyester Membranen und einem Insertdurchmesser von 12 mm und einer Fläche von 1 cm² kultiviert. Porcine RPE Zellen wurden in einer Dichte von 10⁶ Zellen pro ml ausgesät, und das ca. 10 tägige Wachstum bis zum Erreichen eines konfluenten Zellmonolayers mit stabilem TER verfolgt. Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2 Tage. Der TER wurde berechnet unter Abzug des Hintergrund-Widerstandwertes eines leeren Filters in Medium von 120 Ω cm².

2.12 Paraffinschnitte

2.12.1 Gewebefixierung und -bearbeitung

Bei Paraffinschnitten werden die Präparate nach Fixierung und Entwässerung in flüssiges Paraffin eingebettet. Die entnommenen Augen wurden zur Fixierung des Gewebes für mehrere Stunden in Paraformaldehydlösung 4% inkubiert. Danach wurden die Präparate in einen automatischen Entwässerungsapparat gegeben. Hier wurden über Nacht folgende Schritte durchgeführt: 1 h Ethanol 70%, 1 h Ethanol 96%, 1 h Ethanol 96%, 1 h Ethanol 96%, 1 h Ethanol 100%, 1 h Ethanol 100%, 1 h Ethanol 100%, 3 x 1 h Chloroform, 2 h Paraffin 55°C, 3 h Paraffin 55°C. Danach wurden die Präparate mit 55 °C warmem Paraffin zu Blöcken eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert. Am Rotationsmikrotom wurden 8µm dicke Schnitte angefertigt.

2.12.2 Vorbereitung für die Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zur Vorbereitung für die Färbung 15min bei 65°C im Wärmeschrank abgeschmolzen, um eine vollständige Trocknung und bessere Haftung am Objektträger zu gewährleisten. Danach erfolgte die Entfernung des Einbettmediums mit Hilfe von Xylol. Bei der Entparaffinisierung wurden die Schnitte für je 10min in zwei aufeinanderfolgende Xylolbäder gegeben. Bei der anschließenden Rehydrierung des Gewebes wurden die Schnitte für jeweils 10min in einer absteigenden Ethanolkonzentrationsreihe (absoluter Ethanol 2x, 96%, 90%, 80%, 70%) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Aqua dest. für 5min.

2.12.3 Immunohistologische Färbungen

Die Paraffinschnitte wurden für 10 min mit dem Waschpuffer PBS/Tween gespült und anschließend 30 min mit einer Blockierlösung (0.5 % Triton x 100, 10 % Ziegen Serum, 1 x PBS pH 7.4, Aqua dest.) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Der Gewebeschnitt wurde nun mit der Primärantikörperlösung anti-Rhodopsin (1:100) in (0.1 % Triton x 100, 2 % Ziegen Serum, 1 x PBS pH 7.4 Aqua dest.) ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten je 10 min mit Waschpuffer

wurde für 45 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert, welcher über ein Fluoreszenzsignal verfügt. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI beigegeben. Nach dreimaliger Spülung mit Waschpuffer wurde der Gewebeschnitt nun mit einem Tropfen Eindeckmittel (Fluorescence Mounting Medium, DAKO) eingedeckt. Bis auf die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten alle Schritte bei RT. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer um die Austrocknung der Schnitte zu verhindern.

2.12.4 Immunozytochemische Färbungen

Porcine RPE Zellen, auf Transwell polycarbonate Filtern, oder auf Deckgläschen wurden mit PBS gewaschen, und sofort mit 4% Paraformaldehyd für 5 Minuten bei RT fixiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit PBS/Tween. Nach 30 minütiger Inkubation mit der Blockierlösung (0.5 % Triton x 100, 10 % Goat Serum, 1 x PBS pH 7.4, Aqua dest.) wurde die Primärantikörperlösung anti-BK (1:50), anti-Ca_v1.3 (1:100), anti-β-Catenin (1:100) in (0.1 % Triton x 100, 2 % Goat serum, 1 x PBS pH 7.4 Aqua dest.) zugegeben ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrten a 10min mit Waschpuffer wurde für 45min mit dem sekundären, mit einem Fluoreszenzsignal gekoppelten Antikörper inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI beigegeben. Nach dreimaliger Spülung mit Waschpuffer wurde der Gewebeschnitt nun mit einem Tropfen Eindeckmittel eingedeckt. Bis auf die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten alle Schritte bei RT. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer um die Austrocknung der Schnitte zu verhindern.

2.13 Statistische Analyse

Die Daten wurden gezeigt als Mittelwerte ± SEM. Statistische Signifikanzen wurden berechnet unter Verwendung vom Student's t Test mit p Werten [$p < 0.05$ (signifikant); $**p < 0.01$ (hoch signifikant) und $***p < 0.001$ (extrem hoch signifikant)]. Berechnungen wurden in Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, München) durchgeführt.

Die in-vitro Phagozytose Experimente wurden in 96-Loch Zellkulturplatten durchgeführt. Dabei wurde jeder Versuchsansatz in 5 – 8fachen Replikaten ausgeführt und in mindestens 3 unabhängigen Experimenten wiederholt. Angegeben

ist die Zahl der ausgewerteten Zellkulturplattenlöcher (z.B. n=24) aus 3 Wiederholungen. Die Auswertung der Daten erfolgte im Bezug auf 100%, welches der Phagozytose der Zellen unter Kontrollbedingungen entspricht.

Bei Untersuchungen zur Phagozytose in vivo in den Mausmodellen wurden pro Genotyp und Zeitpunkt Daten von 5 Mäuse erhoben. Von den Paraffinpräparaten wurden sowohl zentrale als auch periphere Retinaschnitte angefertigt, und pro Auge 6 immunohistochemisch gefärbt. Dabei wurden pro Schnitt in 3-5 Abschnitten a 100µm die Anzahl der Phagosomen ausgewertet.

Western Blot Experimente zum Nachweis des Protein knock-downs von Bestrophin-1 und Orai-1 wurden von 3 unabhängigen Transfektionen durchgeführt. Ebenso wurden die Western Blot Experimente zur Untersuchung des Rhodopsingehalts in Augen 3fach wiederholt.

3. Ergebnisse

3.1 Phagozytose porciner RPE Zellen in vitro

3.1.1 Etablierung eines Zellkultursystems zur Messung der Phagozytose, Validierung der Methode

Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) weisen eine rezeptorvermittelte Phagozytose, spezifisch für Außensegmente von Photorezeptoren (OS), auf. Zu ihrer Untersuchung wurde ein in vitro Modellsystem etabliert, welches pharmakologische Blockierung der Ionenkanalaktivität oder siRNA basierten knock-down von Proteinen ermöglicht. Zur Etablierung des in vitro Phagozytoseassays in porcinen RPE Zellen wurde in einer ersten Versuchsreihe die für diese Experimente optimale Menge an eingesetzten OS ermittelt. Dazu wurden die RPE Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von OS inkubiert. Nach Beendigung der 4 stündigen Inkubationszeit zeigte sich hierbei mit Einsatz von zunehmender OS Menge ein Anstieg der detektierbaren Fluoreszenzintensität pro Well.

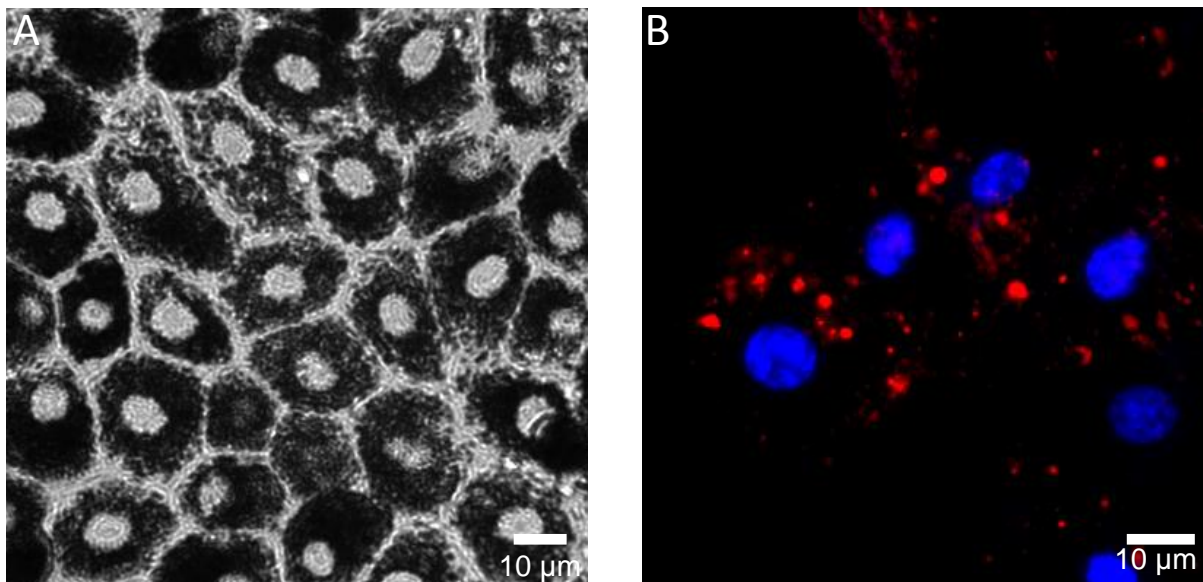


Abbildung 3.1: In vitro Phagozytose Messung fluoreszenzmarkierter Photorezeptoraußensegmente (OS) durch primäre porcine retinale Pigmentepithelzellen. A Lichtmikroskopische Aufnahme 48h kurzzeitkultivierter RPE Zellen. B Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme markierter OS (in rot) nach 1 stündiger Inkubation mit RPE. Die Zellkerne sind durch DAPI Färbung in blau erkennbar.

So wurde bei einer Zugabe von 5×10^6 OS eine Intensität von $2,9 \pm 0,45$ ($n=6$) gemessen. Im Vergleich dazu zeigte sich bei höherer OS Konzentrationen (1×10^7) ein Wert von $7,3 \pm 2,6$ ($n=6$), der bei der höchsten eingesetzten Konzentration (2×10^7) bis auf $19,5 \pm 3$ ($n=6$) anstieg. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt, da der Verbrauch an OS Material extrem groß war und die Gewinnung aus porcinen Retinae sehr aufwändig. Im Vergleich mit Literatur zu ähnlichen Arbeiten wurde für weitere Experimente eine Konzentration von 5×10^6 pro 96 Well gewählt, welches den Aufwand der OS Präparation in einem vernünftigen Rahmen ermöglichte.

Um einen geeigneten Zeitpunkt für die Phagozytosemessung in primären porcinen RPE Zellen zu ermitteln, wurden Zellen mit 5×10^6 OS pro Well einer 96er Zellkulturschale inkubiert und der zeitliche Verlauf der Phagozytose verfolgt. Hier zeigte sich eine erste Aufnahme von OS bereits nach 30 min. Ein steiler Anstieg der gemessenen Fluoreszenz erfolgte zwischen 2 und 8 Stunden, welcher sich bis zum Zeitpunkt von 14 weiter fortsetzte. Für weitere Experimente wurde eine mittlere Inkubationszeitdauer von 5 h gewählt. Dieser Untersuchungszeitpunkt liegt innerhalb der Phase der stark ansteigenden OS Aufnahme durch die Zellen.

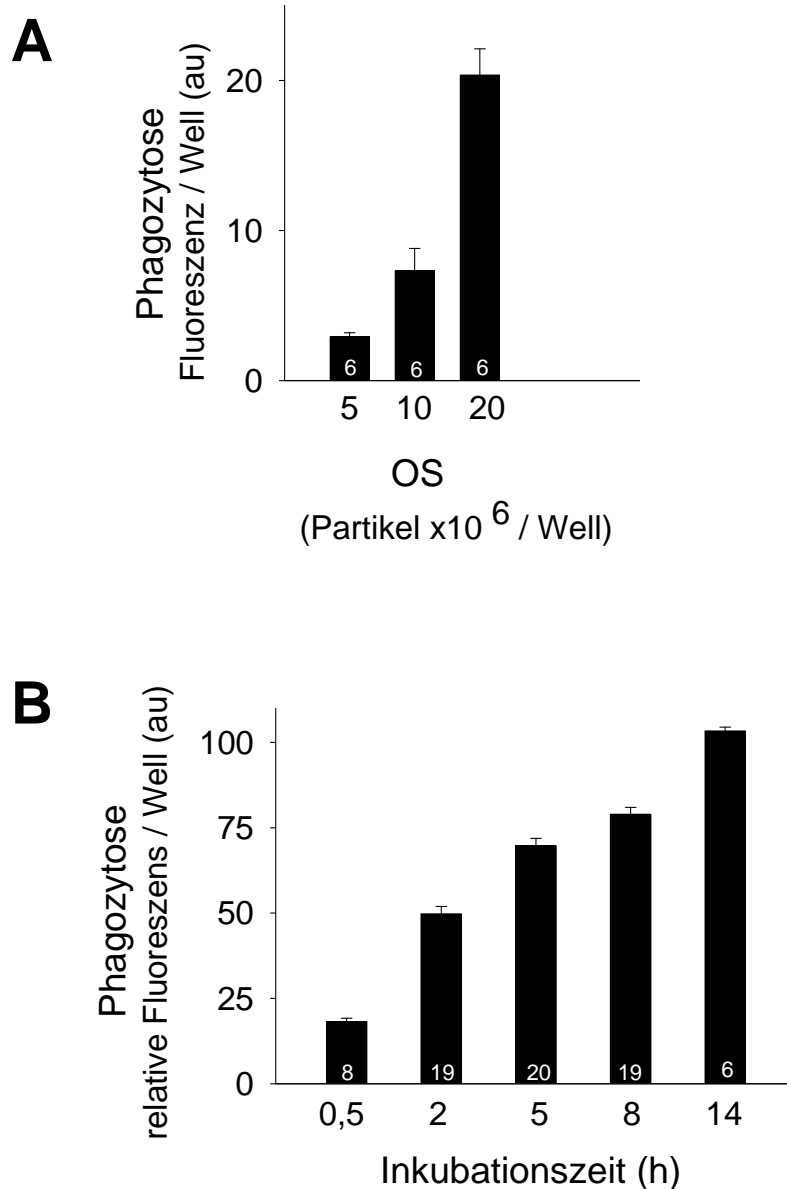


Abbildung 3.2: In vitro Phagozytose Messung primärer porciner RPE Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an zugeführten Photorezeptoraußensegmentpartikeln (OS) und der Inkubationszeit. A Phagozytoseaktivität in Abhängigkeit von der OS Konzentration, gemessen nach 4h. (1 Experiment mit je 6 Proben) B Zeitlicher Verlauf der OS Phagozytose bei einer Zugabe von 5×10^6 OS / Well. (1-4 unabhängige Experimente bestehend aus je 6-8 Proben.)

3.1.2 Expression von $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} Kanälen, Bestrophin-1 und BK K^+ Kanälen in porcinen RPE Zellen

Durch immunohistochemische Färbungen wurde die Expression der Ionenkanäle $\text{Ca}_v1.3$, Bestrophin-1 und BK in primären porcinen RPE Zellen überprüft. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Zellkultursystems für Phagozytose in vitro Untersuchungen war die endogene Expression von Bestrophin-1. Mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern ist eine zuverlässige Detektion porcinen Bestrophin-1 Proteins möglich. Nach 48 stündiger Kultur der Zellen war, dank der gewählten Kulturbedingungen wie sehr hoher Zelldichte und reduziertem Serumgehalt des Mediums, zum Zeitpunkt des Experiments eine stabile Bestrophin-1 Expression nachweisbar. Eine Färbung an polarisierten RPE Zellen auf Zellfiltern, zeigt das Vorkommen von Bestrophin-1 Protein lateral, nahe der Zellmembran und zytosolisch (Abb.3.3 A, C).

In polarisierten RPE Zellen konnte weiterhin die Expression von $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} Kanälen nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich das punktuelle Expressionsmuster für die $\text{Ca}_v1.3\alpha1D$ porenbildenden Untereinheiten im Bereich der lateralen Zellmembranen, welche durch eine Färbung mit β -Catenin markiert wurden (Abb.3.3 E, G). Eine Ko-Färbung von Bestrophin-1 und $\text{Ca}_v1.3$ verdeutlicht eine Ko-lokalisierung beider Proteine (Abb.3.3 B, D).

Die Proteinexpression von BK K^+ Kanälen war anhand der Färbungen nachweisbar. In Co-Färbungen mit β -Catenin konnten die porenbildenden Untereinheiten ebenfalls in der lateralen Membran lokalisiert werden. Weiterhin konnte BK Protein apikal in den Zellen detektiert werden (Abb. 3.3 F, H).

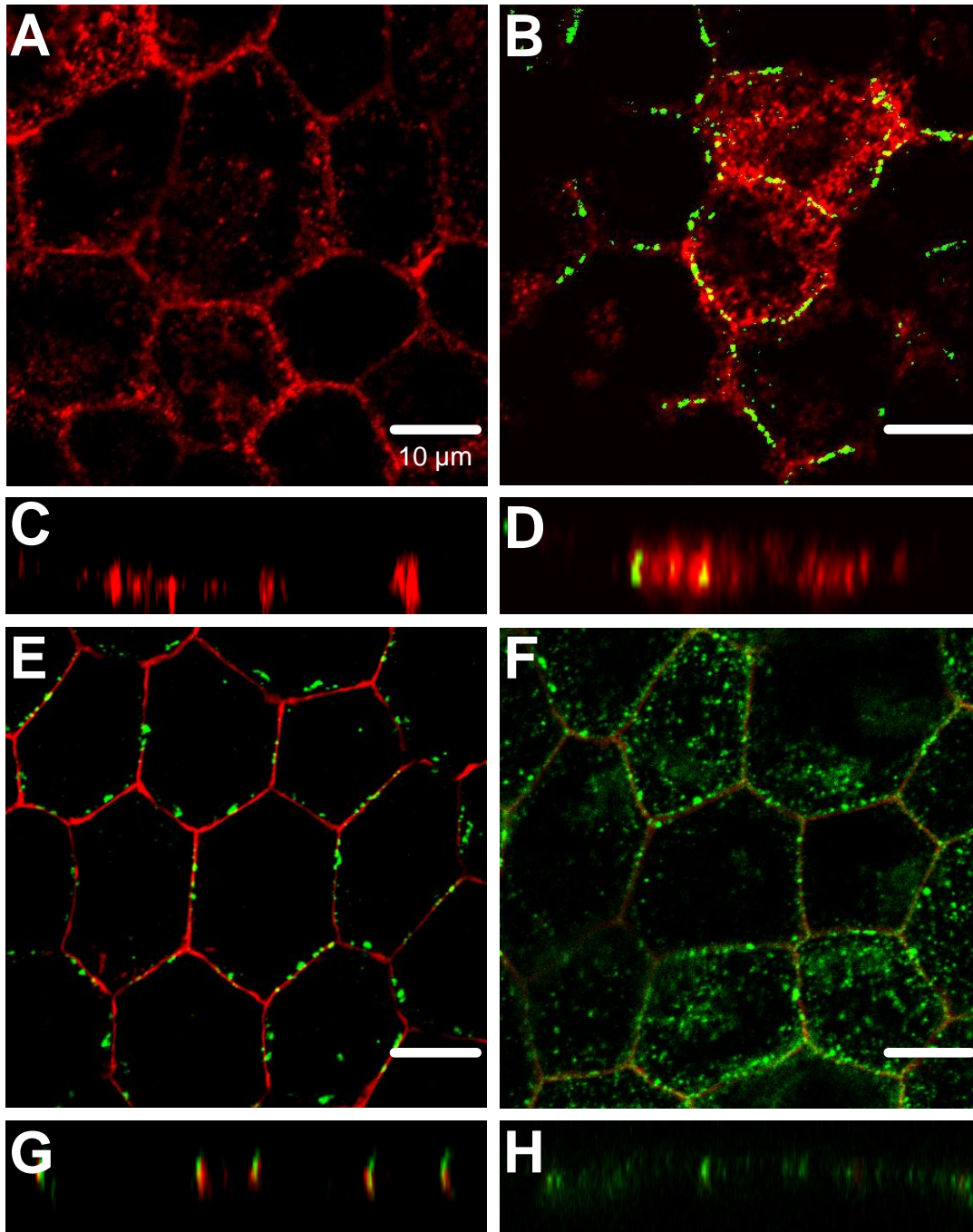


Abbildung 3.3: Bestrophin-1, $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} Kanäle und BK K^+ Kanäle in porcinen RPE Zellen. Kultur primärer porciner RPE Zellen: A, C: Immunofluoreszenznachweis von Bestrophin-1. B, D: Immunofluoreszenznachweis von $\text{Ca}_v1.3$ (grün) und Co-färbung mit Bestrophin-1 (rot). E, G: Immunofluoreszenznachweis von $\text{Ca}_v1.3$ (grün) und Co-färbung mit β -Catenin (rot). F, H: Immunofluoreszenznachweis von BK (grün) und Co-färbung mit β -Catenin (rot), C, D, G, H: Immunofluoreszenznachweis untersucht in der xz Ebene.

3.1.3 Bestrophin-1

3.1.3.1 Subzelluläre Lokalisation von Bestrophin-1

In dieser Arbeit wurde ein Assay etabliert, um die intrazelluläre Lokalisation von Bestrophin-1 zu untersuchen. Hierzu wurden frisch isolierte porcine RPE-Zellen verwendet. Die verschiedenen Schritte der Sucrosedichte-zentrifugationen lieferten 3 Fraktionen in denen Zellmembran oder Membranen vesikulärer Strukturen angereichert waren, und die mittels Western Blot auf ihre Zusammensetzung hin analysiert wurden.

Im initialen Pellet fand sich eine starke Anreicherung des Zellmembranproteins β -Catenin. Die Plasmamembran Fraktion war frei von Bestrophin-1 und zeigte sehr schwach eine geringe Menge an Clc3 und Myosin7A. Das aus dem initialen Überstand gewonnene „low speed pellet“ zeigte eine Anreicherung der Proteine des endoplasmatischen Reticulums Clc3 und Myosin-7A. Auch Bestrophin-1 war hier zu finden. Ein im nächsten Zentrifugationsschritt aus dem Überstand gewonnenes „high speed Pellet“ (HSP) zeigte eine weitere Aufkonzentrierung von Myosin-7A und Clc3. Es enthält eine höhere Konzentration von Bestrophin-1.

So zeigte sich, dass Bestrophin-1 kaum in Fraktionen mit hohem Anteil an Zellmembranproteinen zu finden war, sondern in Fraktionen mit einer Anreicherung an Proteinen zytosolischer vesikulärer Membranen.

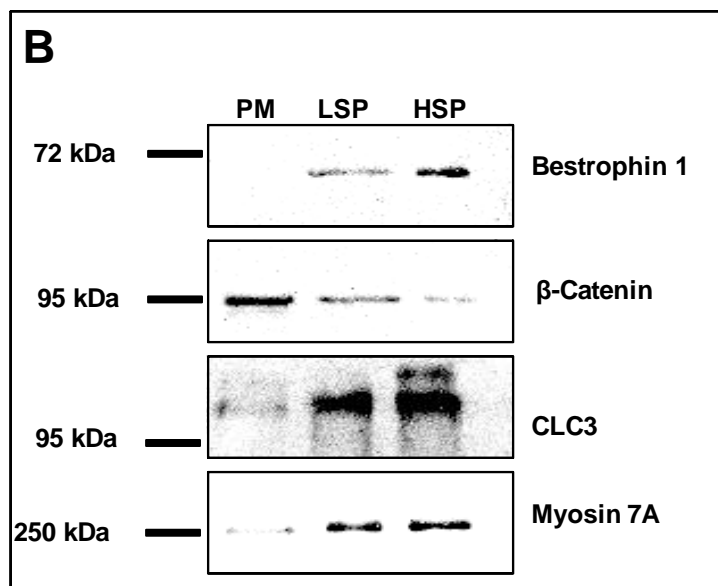
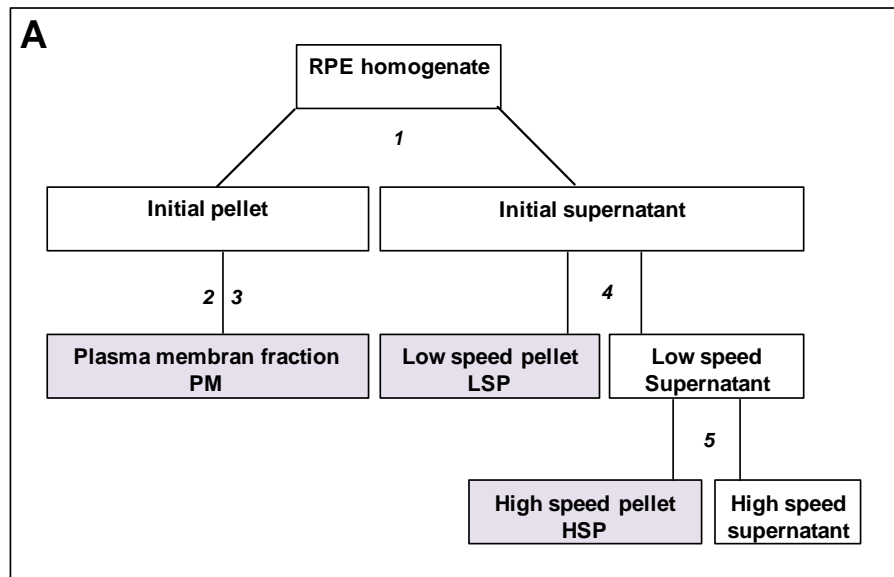


Abbildung 3.4: Analyse der subzellulären Lokalisation von Bestrophin-1 mittels biochemischer Methoden. A Schema zur differentiellen Zentrifugation, die benutzt wurde um Fraktionen von Membranproteinen der Zellmembran und cytosolische Membranstrukturen zu trennen. Ein Zelllysat von frisch isolierten porcinen RPE Zellen wurde hergestellt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 19000g (1) wurde ein initiales Pellet erzeugt, was zur Gewinnung der Plasmamembran Fraktion genutzt wurde (2,3). Aus dem Überstand wurde das low speed pellet (LSP) (4) und ein high speed Pellet (HSP) (5) gewonnen. B Western blot Analyse der Pellets aus der differentiellen Zentrifugation. Der Blot wurde mit Antikörpern gegen Bestrophin-1, β-Catenin, Clc3, und Myosin-7A entwickelt. Bestrophin-1 wurde hauptsächlich in der Fraktion mit der höchsten Anreicherung cytosolischer Membran Proteine gefunden (Neussert, Muller et al. 2010).

3.1.3.2 Expression von P2Y Rezeptoren im RPE

Endogen exprimiertes Bestrophin-1 beeinflusst Ca^{2+} Signale im RPE. Die ATP induzierte Stimulation von purinergen P2Y Rezeptoren mit der nachfolgenden Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern, ruft unterschiedliche Antworten in RPE Zellen von Bestrophin-1 knock-out Mäusen und wildtyp Kontrollen hervor.

Um mögliche Ursachen für differente Erscheinungen zu untersuchen, Unterschiede in der Expression von P2Y Rezeptoren zwischen wildtyp und *Best1*^{-/-} RPE auszuschließen, und damit sicherzustellen, dass der Effekt wirklich auf den Verlust von Bestrophin-1 Protein zurückzuführen ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit qPCR Experimente durchgeführt. Hier wurde das Expressionsprofil von P2Y Rezeptoren in kultivierten RPE Zellen analysiert.

In Zellkulturen von wildtyp und *Best1*^{-/-} Mäusen, wurde die Expression der P2Y Rezeptoren 1,2,4 und 6 nachgewiesen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Expressionsrate zwischen den beiden Gruppen.

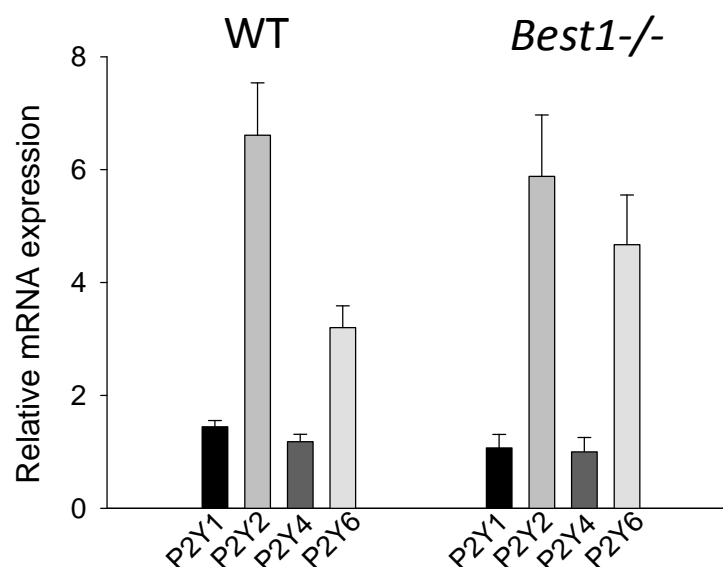


Abbildung 3.5: qPCR zur Analyse der P2Y Rezeptor Expression in kultivierten RPE Zellen von WT oder *Best1*^{-/-} Mäusen. Die Expressionsrate von P2Y Rezeptor mRNA wurde relativ zur β -Aktin Expression normalisiert. (Neussert, Muller et al. 2010)

3.1.3.3 Einfluss von Bestrophin-1 auf die Phagozytose

Bestrophin-1 interagiert direkt mit den β -Untereinheiten der $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} Kanäle des RPE. Dabei führt die Interaktion mit Bestrophin-1 zur Hemmung der Ca^{2+} Kanalaktivität. In einem Versuchsansatz sollte der funktionelle Einfluss von Bestrophin-1 auf die Phagozytose, über die modulatorische Aktivität des Proteins an $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} Kanälen, in vitro gezeigt werden.

48 Stunden kurzzeitkultivierte primäre porcine RPE Zellen zeigen eine stabile Expression von Bestrophin-1 Protein. Im Western Blot konnte hier ein Proteinnachweis mit einem Signal bei 68 kDa erbracht werden. Mittels siRNA Technologie konnte eine Reduktion der Proteinexpressionsrate in diesen Zellen erzielt werden. In der antikörperbasierten Proteindetektion wurde die Menge an vorhandenem Protein detektiert und im Verhältnis zu β -Aktin normalisiert. Hier zeigte sich in den siRNA Bestrophin-1 transfizierten Zellen im Vergleich zur der mit unspezifischer siRNA transfizierten Kontrollgruppe eine Reduktion der Proteindetektion um $80\% \pm 10,2\%$ ($n=3$, Abb.3.6).

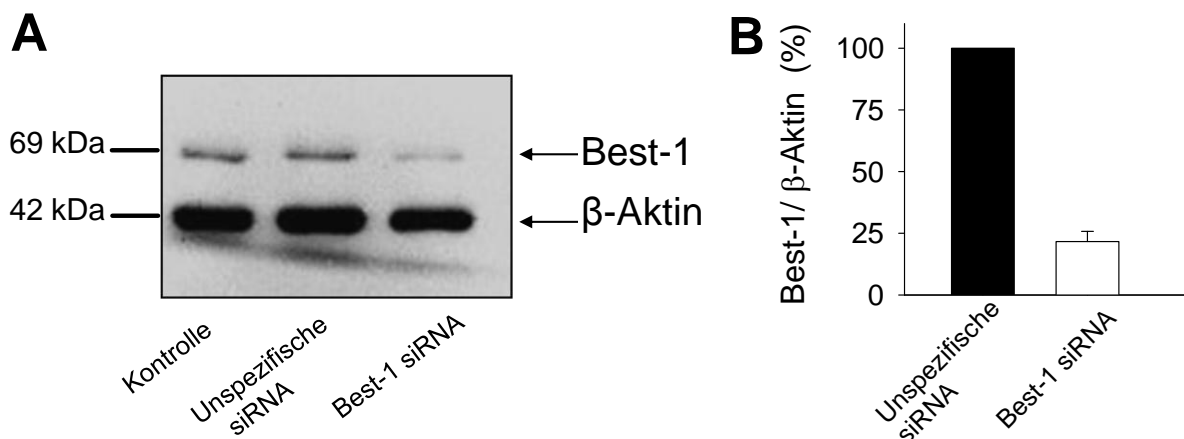


Abbildung 3.6: Knock-down von Bestrophin-1. A Western Blot zur Proteindetektion von Bestrophin-1 in Gesamtzelllysaten 48 Stunden kurzzeitkultivierter porciner RPE Zellen. Bestrophin-1 und Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern in untransfizierten Kontrollzellen, mit unspezifischer siRNA transfizierten Zellen und mit Bestrophin-1 spezifischer siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen. Gezeigt ist exemplarisch 1 Western Blot von 3 Experimenten. B Quantifizierung der Bestrophin-1 Proteinmenge relativ zu β -Aktin nach Densitometrieanalyse ($n=3$).

Im in vitro Phagozytose Experiment wurde der Einfluss von Bestrophin-1 auf die RPE OS Phagozytose untersucht. Die Reduktion der Bestrophin-1 Proteinexpression mittels siRNA knock-down führte zu einer erhöhten Phagozytoseaktivität der Zellen. Die gemessene Fluoreszenz pro Well von Zellen unter siRNA Bestrophin-1 Behandlung ist signifikant um $16\% \pm 4$ ($n=18$, $p<0,001$) erhöht, im Vergleich zu Zellen die mit sequenzunspezifischer siRNA transfiziert wurden.

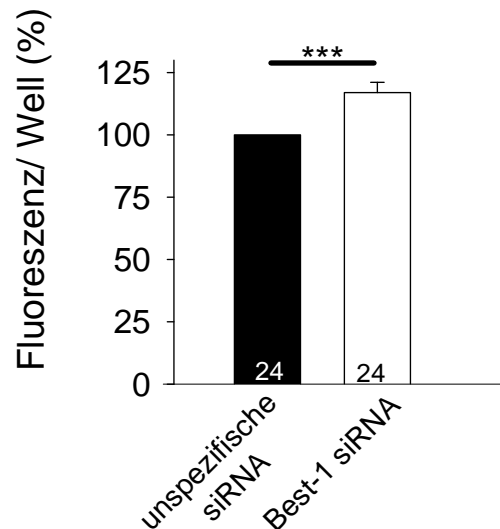


Abbildung 3.7: Einfluss von Bestrophin-1 auf die OS Phagozytose von primären porcinen RPE Zellen nach 5 stündiger Inkubation. Knock-down von Bestrophin-1. Phagozytose im RPE Bestrophin-1 siRNA transfizierter Zellen versus mit unspezifischer RNA transfizierter Zellen. (Durchgeführt wurden 4 unabhängige Experimente mit jeweils 5-8 parallelen Ansätzen.)

3.3 Ca^{2+} Kanäle

3.3.1 Beteiligung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen an der Regulation der Phagozytose

Die Beteiligung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen an der Regulation des Phagozytoseprozesses wurde durch pharmakologische Modulation der Kanalaktivität untersucht. Die Blockierung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen mittels (+)-Bay K 8644 ($10\mu\text{M}$) führte zu einer signifikant reduzierten Phagozytose. In Anwesenheit von (+)-Bay K 8644 zeigte sich nach 5 stündiger Inkubation eine Verminderung der gemessenen absoluten Fluoreszenz pro Well um $8\% \pm 1,3$ ($n=13$, $p<0,001$, Abb.3.8 A) im

Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Verwendung von (-)-Bay K 8644 (10 μ M), einem Aktivator der L-Typ Kanäle, führte zu keiner Veränderung in der Phagozytoseaktivität in den durchgeführten Versuchen (3.8 B).

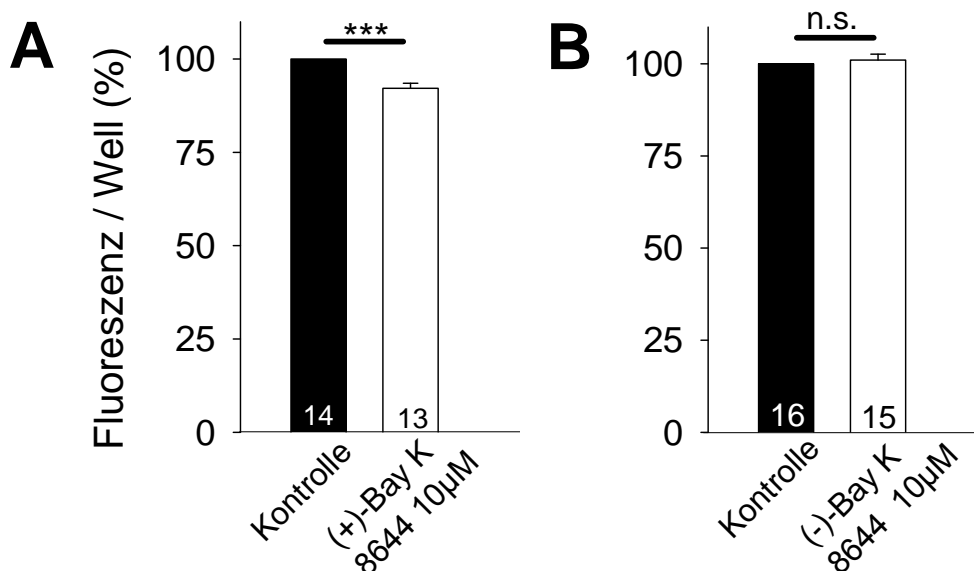


Abbildung 3.8: Einfluss von (+)-Bay K 8644 und (-)-Bay K 8644 auf die OS Phagozytose von primären porcinen RPE Zellen nach 5 stündiger Inkubation. (Durchgeführt wurden 3 unabhängige Experimente mit jeweils 5 parallelen Ansätzen.)

3.3.2 Einfluss von Orai-1 auf die Phagozytose

Mit Hilfe des knock-downs von Orai-1 sollte geklärt werden, ob ein Einfluss von Orai-1 auf die Phagozytose in RPE Zellen besteht. Im Western Blot konnte Orai-1 Protein mit einem Signal bei 38 kDa nachgewiesen werden. Mittels siRNA Technologie konnte eine Reduktion der Proteinexpressionsrate in diesen Zellen erzielt werden. In der antikörperbasierten Proteindetektion wurde die Menge an produziertem Protein detektiert und im Verhältnis zu β -Aktin normalisiert. Hier zeigte sich in den siRNA Orai-1 transfizierten Zellen im Vergleich zur der mit unspezifischer siRNA transfizierten Kontrollgruppe eine Reduktion der Proteindetektion um $79\% \pm 9,7\%$ ($n=3$, Abb. 3.9).

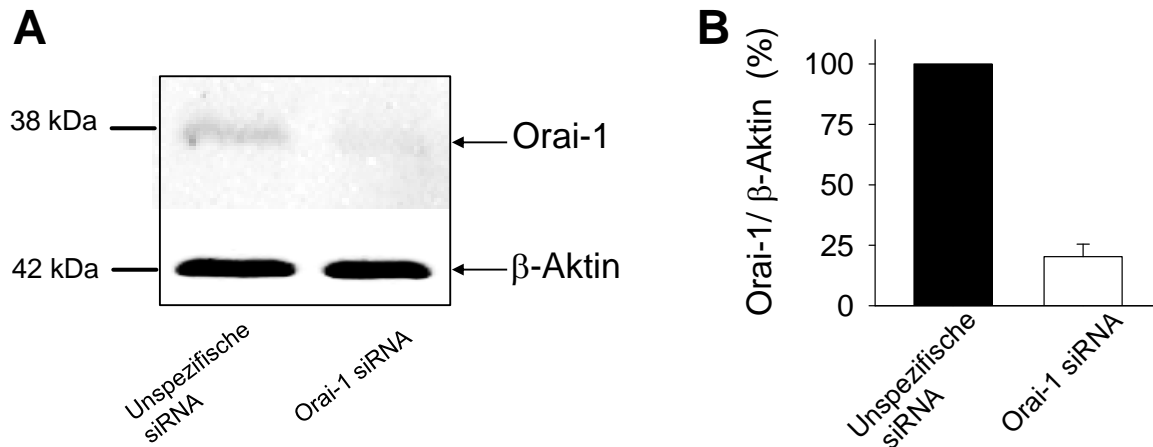


Abbildung 3.9: Knock-down von Orai-1. A Western Blot zur Proteindetektion von Orai-1 in Gesamtzelllysaten 48 Stunden kurzzeitkultivierter porciner RPE Zellen. Orai-1 und β -Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern in mit unspezifischer siRNA transfizierten Zellen und mit Bestrophin-1 siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen. Gezeigt ist exemplarisch 1 Western Blot von 3 Experimenten. B Quantifizierung der Orai-1 Proteinmenge relativ zu β -Aktin nach Densitometrieanalyse (n=3).

Es zeigte sich, dass eine Reduktion der Orai-1 Proteinexpression mittels siRNA knock-down zu keiner veränderten Phagozytoserate von OS durch die RPE Zellen führte (n=23, Abb. 3.10). In vitro Phagozytose Experimente weisen somit nicht auf eine Beteiligung von Orai-1 am Prozess der Phagozytose hin.

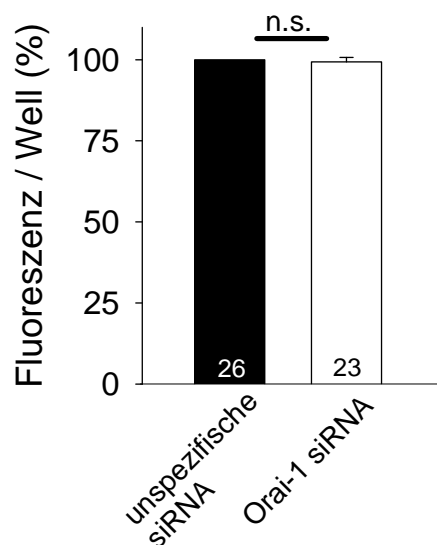


Abbildung 3.10: Einfluss von Orai-1 auf die OS Phagozytose von primären porcinen RPE Zellen nach 5 stündiger Inkubation. Knock-down von Orai-1. Phagozytose Orai-1 siRNA transfizierter Zellen versus unspezifischer siRNA transfizierter Zellen. (Durchgeführt wurden 3 unabhängige Experimente mit jeweils 6-8 parallelen Ansätzen.)

3.3.3 Einfluss von TRP Kanälen vom Vanilloid-Rezeptor Subtyp auf die Phagozytose

Der Einfluss von TRP Kanälen vom Vanilloid-Rezeptor Subtyp (TRPV) auf die Phagozytose von RPE Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Bei Blockierung der TRPV Kanäle durch Ruthenium Rot (20 μ M) kam es zu einer Verminderung der gemessenen Fluoreszenz pro Well um $9\% \pm 1,1$ (n=21, Abb. 3.11 A) im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Hingegen führt eine Aktivierung von TRPV Kanälen mittels 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB, 100 μ M) zu einer Erhöhung der gemessenen Fluoreszenzintensität pro Well um $17\% \pm 2,1$ (n=26, Abb. 3.11 B). In vitro Phagozytose Experimente belegen hier einen Einfluss von TRPV Kanälen auf die Phagozytose.

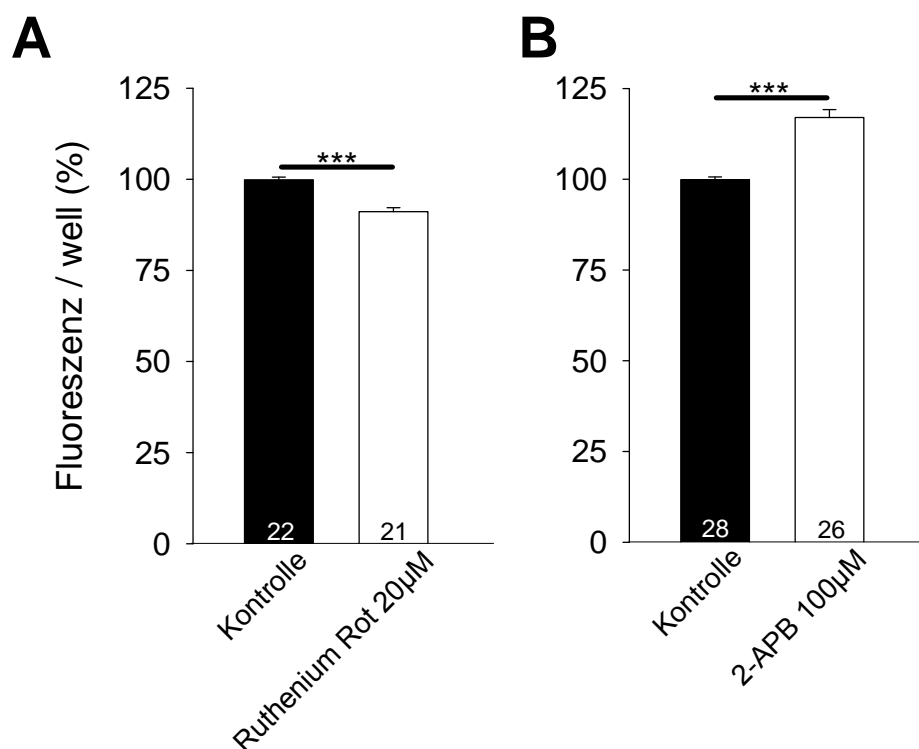


Abbildung 3.11: Einfluss von Ruthenium Rot und 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB) auf die OS Phagozytose von primären porcinen RPE Zellen nach 5 stündiger Inkubation. (Durchgeführt wurden 4 unabhängige Experimente mit 5-8 parallelen Ansätzen.)

3.4 Beteiligung von BK Kanälen an der Regulation der Phagozytose

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die funktionelle Kopplung der BK Kanäle an Ca^{2+} Kanalaktivität einen Einfluss auf die Phagozytosefunktion des RPE besitzt. Bei pharmakologischer Blockierung des BK Kanals in Phagozytose in vitro Experimenten zeigte sich ein inhibitorischer Einfluss durch Paxillin. Eine konzentrationsabhängige Verminderung der Phagozytoseaktivität konnte bei Konzentrationen größer als $5\mu\text{M}$ nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Bei $5\mu\text{M}$ Paxillin sank die Fluoreszenz auf $91\% \pm 0,72$ ($n=15$, $p<0,001$). Mit einer Konzentration von $25\mu\text{M}$ Paxillin konnte eine Reduktion bis auf $76\% \pm 4,8$ ($n=14$, $p<0,001$), im Vergleich zur Kontrollgruppe, gezeigt werden. Bei der größten Konzentration von $75\mu\text{M}$ Paxillin war die Fluoreszenz bis auf $50\% \pm 9$ ($n=14$, $p<0,001$) reduziert.

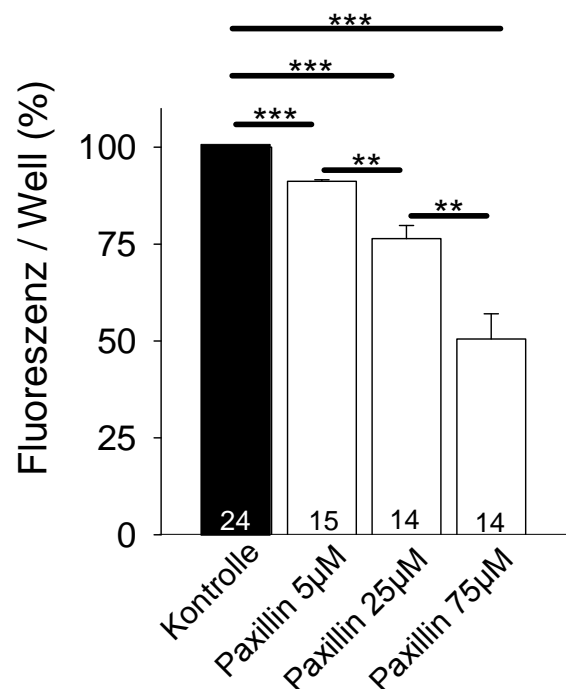


Abbildung 3.12: Einfluss von Paxillin auf die OS Phagozytose von primären porcinen RPE Zellen nach 5 stündiger Inkubation. (Durchgeführt wurden 3-4 unabhängige Experimente mit jeweils 5-6 parallelen Ansätzen.)

3.2 Untersuchungen zur Phagozytose des RPE im Mausmodell

Phagozytose in vitro Experimente weisen auf einen Einfluss von L-Typ Ca^{2+} Kanälen und BK K^{+} Kanälen in der Phagozytose hin, wobei die BK Hemmung den stärksten Effekt hervorrief. In knock-out Tiermodellen für beide Kanalproteine sollte nun der im zirkadianen Rhythmus ablaufende Prozess in vivo untersucht werden. Dazu wurden Mäuse an verschiedenen Tageszeiten getötet, und die Augen entnommen. Von dem in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden anschließend Schnitte angefertigt, und eine immunohistochemische Färbung durchgeführt. Hier konnten mit einem Antikörper für Rhodopsin, einem ausschließlich in den Außensegmenten der Photorezeptoren enthaltenem Protein, spezifisch Phagosomen im RPE detektiert werden. Über die Detektion der vom RPE aufgenommenen Teile der Photorezeptoren konnte Rückschluss auf die Phagozytoseaktivität im Verlauf des Tages gezogen werden. Untersucht wurden jeweils 5 Mäuse pro Zeitpunkt. Von jedem Auge wurden sowohl zentrale als auch periphere Retinaschnitte angefertigt, dabei 6 Schnitte gefärbt, und 3-5 Abschnitte pro Schnitt analysiert.

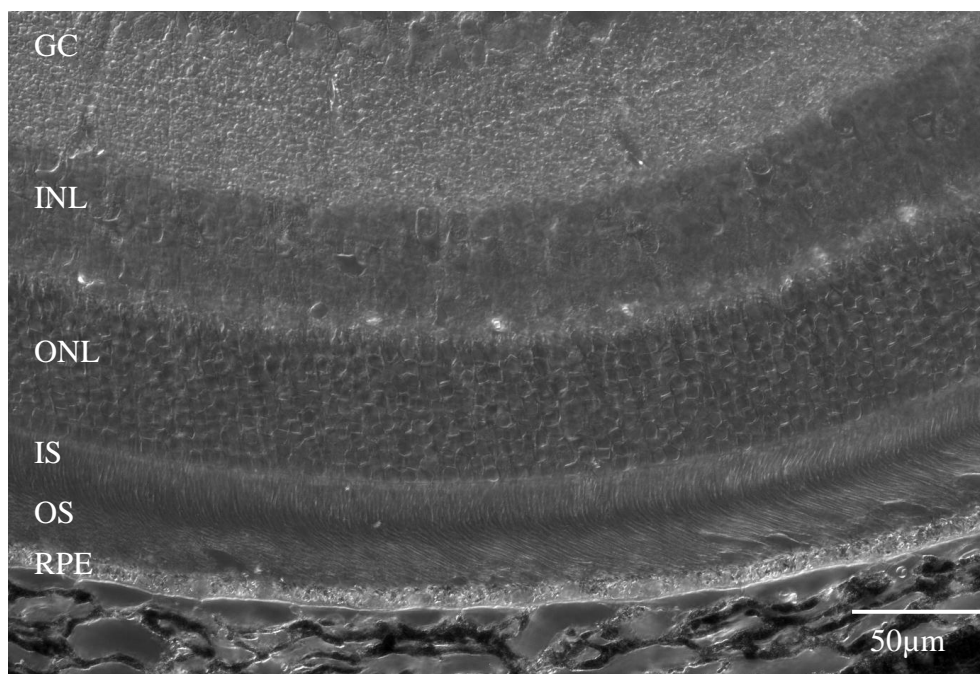


Abbildung 3.13: Gewebeschnitt einer murinen Retina: lichtmikroskopische Aufnahme. (RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL= äußere Kernschicht, OPL=äußere Plexiforme Schicht, INL=innere Plexiforme Schicht, INL=innere Kernschicht).

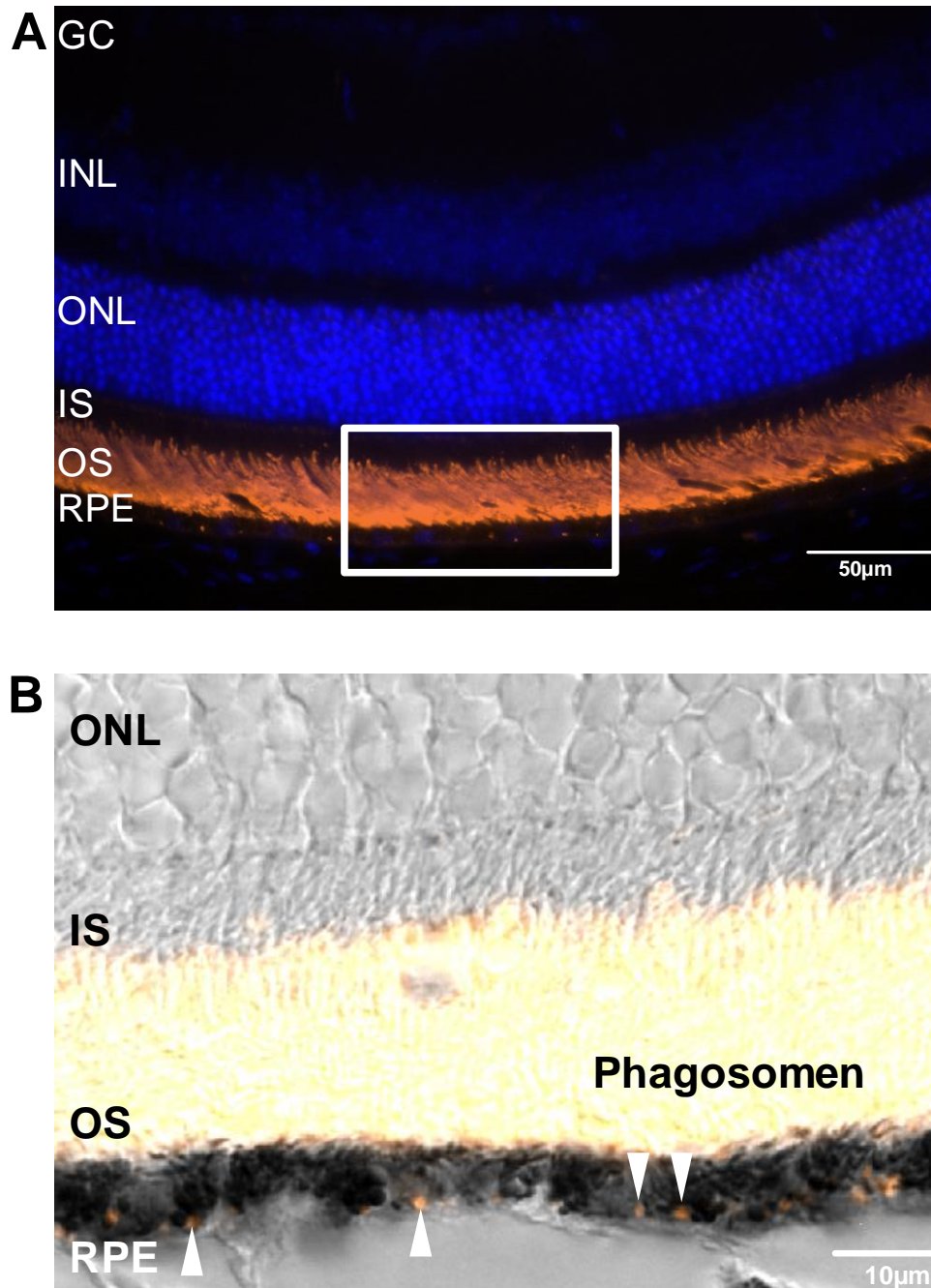


Abbildung 3.14: Gewebeschnitt eines murinen Auges und Immunfluoreszenznachweis von Phagosomen im RPE. A murine Retina: Immunfluoreszenzfärbung von Rhodopsin. Die Färbung zeigt Rhodopsin in den Außensegmenten der Photorezeptoren und rhodopsin-positive Phagosomen im RPE. Färbung der Zellkerne mittels DAPI. B Vergrößerter Ausschnitt mit basolateraler Lokalisation der Phagosomen im RPE, Überlagerung von Lichtmikroskopischer – und Fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme (RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL= äußere Kernschicht, OPL=äußere Plexiforme Schicht, INL=innere Plexiforme Schicht, INL=innere Kernschicht)

3.2.1 Phagozytose in vivo: Untersuchungen im Ca_v1.3 -/- Mausmodell

Nachdem die in vitro Experimente einen Einfluss von L-Typ Ca²⁺ Kanälen auf die Phagozytoserate belegen, sollte im nächsten Schritt der Einfluss der Kanäle auf den im zirkadianen Rhythmus ablaufenden Prozess im Tiermodell untersucht werden. Dazu stand eine Mauslinie, defizient für die porenbildende $\alpha 1D$ Untereinheit von Ca_v1.3 Ca²⁺ Kanälen zur Verfügung. Es wurden drei Untersuchungszeitpunkte im Verlauf des Tages gewählt. Es wurde die Anzahl an Rhodopsin-positiven Phagosomen im RPE innerhalb der morgendlichen Hauptaktivität um 7.30 (30min nach Beginn der Lichtphase), um 8.30 Uhr (90min Licht) ermittelt. Ein weiterer Zeitpunkt am Nachmittag um 14.30 Uhr spiegelt die über den Tagesverlauf hin niedrige Phagozytoseaktivität wieder.

Zum Zeitpunkt 7.30 wurden in den wildtyp Mäusen $11,3 \pm 0,3$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=138 Messwerte aus 48 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) gefunden und in den knock-out Tieren $11,8 \pm 0,4$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=115 Messwerte aus 35 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) detektiert. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Um 8.30 hingegen, dem Zeitpunkt der maximalen Phagozytoseaktivität, wiesen wildtyp Mäuse mit durchschnittlich $14,3 \pm 0,5$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=75 Messwerte aus 30 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) eine signifikant höhere Anzahl an Phagosomen gegenüber den knock-out Tieren mit $10,8 \pm 0,5$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=90 Messwerte aus 33 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) auf.

Bei den um 14.30 untersuchten Tieren war mit $5,3 \pm 0,2$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=86 Messwerte aus 30 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) eine signifikant höhere Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar, welche lediglich $3,4 \pm 0,2$ (n=76 Messwerte aus 28 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) aufwiesen.

Damit zeigen Ca_v1.3-/- Tiere zum Zeitpunkt der maximalen Phagozytoseaktivität eine geringere Anzahl an Phagosomen im RPE, hingegen liegen am Nachmittag noch mehr Phagosomen im RPE vor als in den Kontrolltieren.

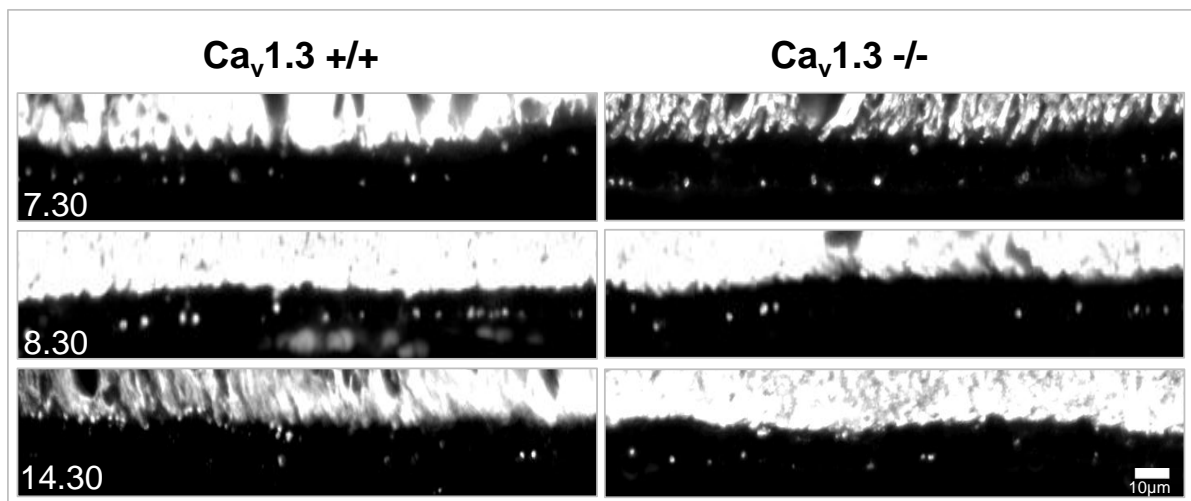
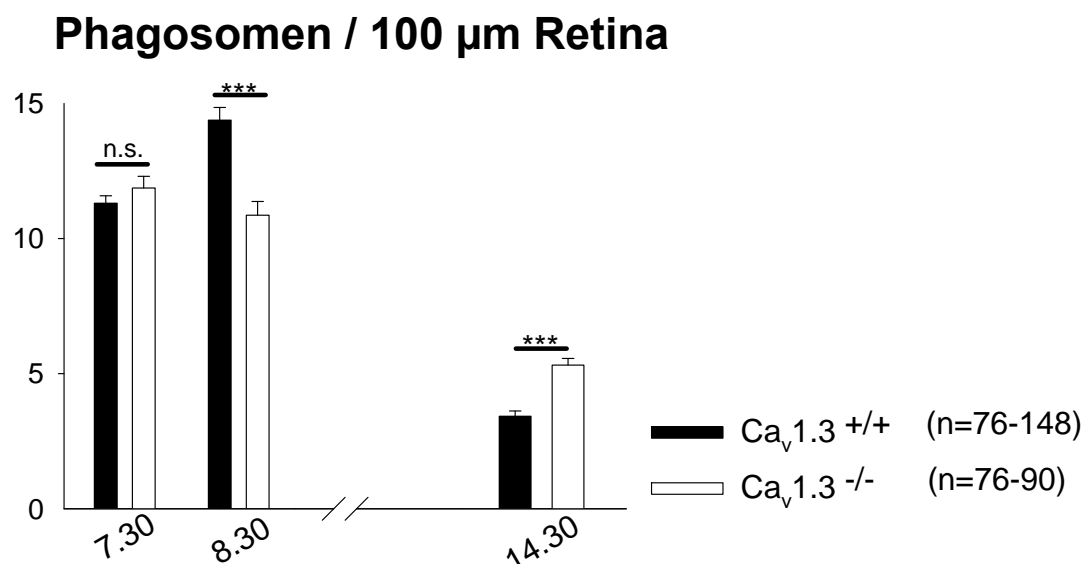
A**B**

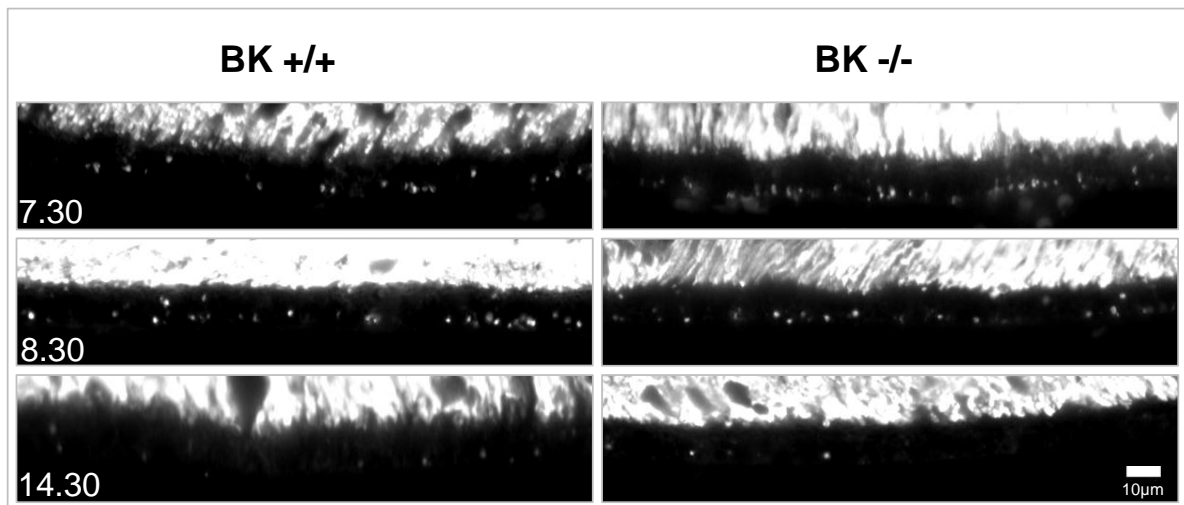
Abbildung 3.15: Phagozytose des RPE in vivo im Ca_v1.3^{-/-} Mausmodell. A Paraffin Gewebeschnitte des Auges, Immunfluoreszenzfärbung von Rhodopsin, Rhodopsin-positive Phagosomen im RPE an verschiedenen Zeitpunkten: 7.30 Uhr (30 min Licht nach Beginn der Lichtphase), 8.30 Uhr (90 min Licht) und 14.30 Uhr, B Anzahl von Phagosomen pro 100µm RPE an verschiedenen Tageszeiten. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM (76-148 Messabschnitte von je 5 Mäusen pro Gruppe). p<0,001.

3.2.2 Phagozytose in vivo: Untersuchungen im BK^{-/-} Mausmodell

Weitere Untersuchungen zur Phagozytose des RPE in vivo erfolgten in einer zweiten Mauslinie, defizient für die porenbildende α Untereinheit des K⁺ Kanals BK. An den Untersuchungszeitpunkten wurden 7.30 in den BK^{-/-} Mäusen $14,5 \pm 0,47$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=59 Messwerte aus 27 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) detektiert, und damit signifikant mehr Phagosomen als in den vergleichbaren Kontrolltieren mit $11,7 \pm 0,39$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=67 Messwerte aus 30 Gewebeschnitten von 5 Mäusen).

Zum Zeitpunkt 8.30 wiesen BK^{-/-} Mäuse $12,8 \pm 0,54$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=90 Messwerte aus 32 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) auf, die untersuchten Kontrolltiere hingegen $15,8 \pm 0,54$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=90 Messwerte aus 30 Gewebeschnitten von 4 Mäusen). Am Nachmittag um 14.30 wurden in den BK^{-/-} Mäusen durchschnittlich $2,8 \pm 0,23$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=53 Messwerte aus 25 Gewebeschnitten von 5 Mäusen) gefunden, in den BK^{+/+} Mäusen hingegen $4 \pm 0,19$ Phagosomen/100 μ m RPE (n=48 Messwerte aus 33 Gewebeschnitten von 5 Mäusen).

Damit zeigen sich an den verschiedenen Zeitpunkten eines Tages signifikante Unterschiede in der Anzahl von Phagosomen zwischen den BK Kanal defizienten Mäusen und Tieren der Kontrollgruppe.

A**B**

Phagosomen / 100 µm Retina

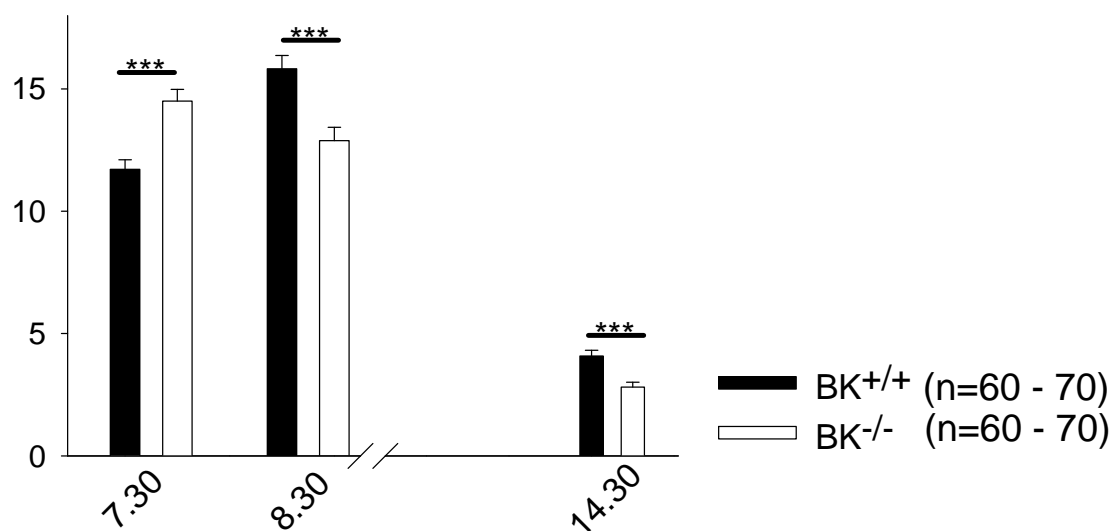


Abbildung 3.16: Phagozytose des RPE in vivo im BK^{-/-} Mausmodell. A Paraffin Gewebeschnitt des Auges, Immunfluoreszenzfärbung von Rhodopsin, Rhodopsin-positive Phagosomen im RPE an verschiedenen Zeitpunkten: 7.30 Uhr (30min Licht), 8.30 Uhr (1,5h Licht) und 14.30 Uhr, B Anzahl von Phagosomen pro 100µm RPE an verschiedenen Tageszeiten. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM (60-70 Messabschnitte von 5-6 Mäusen). $P < 0,001$.

3.2.2.1 Strukturelle Veränderungen in der Retina von BK^{-/-} Mäusen

Im BK^{-/-} Tiermodell zeigten sich Veränderungen im zirkadianen Rhythmus der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten durch das RPE. Da eine gestörte Interaktion beider Zellgruppen einerseits zu Ablagerungen von Lipofuszin im RPE oder andererseits zu Schäden der Photorezeptoren führen kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Retinastruktur der Mäuse untersucht.

Die Messungen zur Länge der Photorezeptoraußensegmente im Gewebeschnitt zeigen strukturelle Veränderungen in den knock-out Tieren auf. Es wurden 7 BK^{+/+} und 9 BK^{-/-} Mäuse im Alter zwischen 12-20 Monaten untersucht. Gemessen wurden hier die Längen der Photorezeptoren, wobei mit Hilfe eines Immunfluoreszenznachweises des ausschließlich im Außensegment enthaltenen Proteins Rhodopsin, eine Unterscheidung zwischen Innensegmenten und Außensegmenten der Photorezeptoren möglich war.

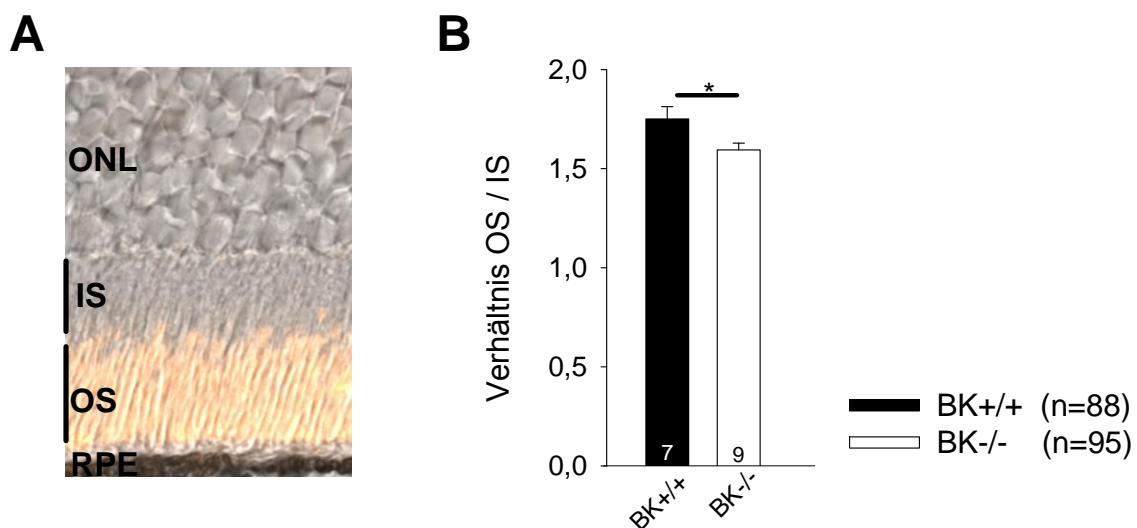


Abbildung 3.17: Bestimmung der Außensegmentlänge von BK^{+/+} und BK^{-/-} Mäusen. A lichtmikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnitts der Retina überlagert mit Immunfluoreszenzfärbung von Rhodopsin, als Marker für die Außensegmentabschnitte der Photorezeptoren. Gemessen wurden Längen der Außen- und Innensegmente von Photorezeptoren. B Quotient aus Außen- und Innensegmentlänge. (RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL= äußere Kernschicht)

Es zeigte sich eine Verkürzung der Außensegmente der Photorezeptoren bei den BK-/-Tieren um durchschnittlich 10 Prozent. Relativ ins Verhältnis zur Innensegmentlänge gesetzt weisen sie mit $1,59 \pm 0,03$ (n=95 Messwerte aus 40 Gewebeschnitten) eine signifikant niedrigere Außensegmentlänge auf als BK+/+ Tiere mit $1,75 \pm 0,06$ (n=88 Messwerte aus 39 Gewebeschnitten).

3.2.2.2 Untersuchungen zu Lipofuszinablagerungen im RPE von BK-/- Mäusen

Störungen im Phagozytoseprozess können zu Ablagerungen von Abbaumaterialien der Photorezeptoraußensegmente im RPE führen. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden, ob BK-/- Tiere eine vermehrte Anreicherung von Lipofuszin in RPE Zellen aufweisen.

Dazu wurden Gewebeschnitte muriner Retinae mikroskopisch auf Autofluoreszenz hin untersucht. Im Alter von 12 Monaten wiesen sowohl BK+/+ (n=3 Mäuse) als auch BK-/- Tiere (n=3 Mäuse) keine mikroskopisch detektierbare Autofluoreszenz auf. Bei 20 Monate alten Mäusen wurden hingegen in beiden Gruppen (BK+/+ n=3 Mäuse, BK-/- n=3 Mäuse) gleichermaßen Anreicherungen autofluoreszenten Materials im RPE gefunden (Abb. 3.18). Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen konnte kein Hinweis auf vermehrte Lipofuszinablagerung in BK-/- Mäusen gefunden werden.

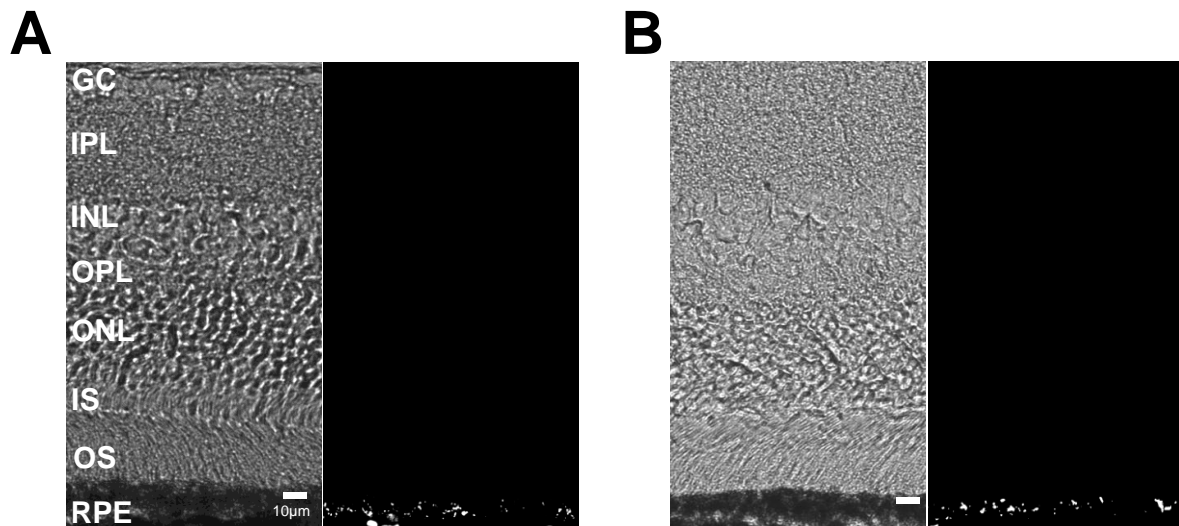


Abbildung 3.18: Anreicherung von autofluoreszentem Material im RPE von 20 Monate alten BK+/+ und BK-/- Mäusen. Paraffingewebeschnitte der Retina von A BK+/+, B BK-/- Tieren. (RPE=Retinales Pigmentepithel, OS=Außensegmente der Photorezeptoren, IS=Innensegmente der Photorezeptoren, ONL=äußere Kernschicht, OPL=äußere Plexiforme Schicht, INL=innere Plexiforme Schicht, INL=innere Kernschicht)

3.2.2.3 Untersuchung des Rhodopsingehalts in Retinae von BK-/- Mäusen

Histologisch wurde im Tiermodell eine Verkürzung der Photorezeptoraußensegmente festgestellt. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob der Gehalt an Rhodopsin Protein, welches ausschließlich in den Außensegmenten vorkommt, in den Augen von BK-/- Mäusen nachweislich vermindert ist.

Hierfür wurden Gesamtzelllysate von Bulbi 14-18 Monate alter Mäuse gewonnen (n=3 BK+/+ Mäuse, n=3 BK-/- Mäuse). Die Zielproteinmenge wurde mittels spezifischer Antikörper gegen Rhodopsin im Western Blot-Verfahren detektiert. β -Aktin diente dabei als Ladekontrolle. Die Western Blot-Analysen bestätigten einen reduzierten Rhodopsingehalt in den Bulbi von knock-out Tieren. Der Rhodopsingehalt zeigte sich in diesen Untersuchungen im Vergleich zu den Kontrolltieren um durchschnittlich $28\% \pm 5$ (n=3, Abb.3.19) verringert.

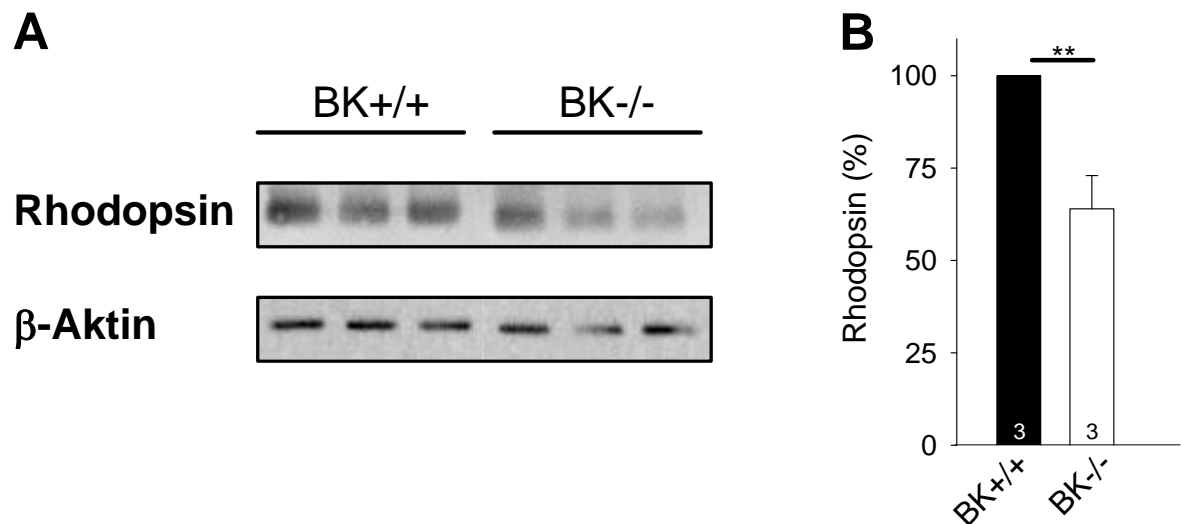


Abbildung 3.19: Rhodopsingehalt der Augen von BK-/- Mäuse. A Western Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten der Augenbecher von BK+/+ (n=3) und BK-/- (n=3) Mäusen. Detektion von Rhodopsin und β -Aktin mittels spezifischer Antikörper, B Rhodopsingehalt relativ zur detektierten Aktin Ladekontrolle. (Daten aus 3 unabhängige durchgeführten Experimenten, gezeigt ist exemplarisch ein Western Blot.)

4. Diskussion

4.1. Untersuchungen zur Beteiligung von Ionenkanälen an der Regulation der Phagozytose in vitro

4.1.1 Zellkultursystem zur Messung der Phagozytose primärer porciner RPE Zellen in vitro

In der Literatur sind verschiedene Techniken beschrieben, mit deren Hilfe es möglich ist die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) durch RPE Zellen in Kultur zu untersuchen. Dabei umfasst das Spektrum der eingesetzten Methoden Radioimmunoassays (Laird and Molday 1988; Kennedy, Rakoczy et al. 1994; Ryeom, Sparrow et al. 1996), Elektronenmikroskopie (Edwards and Szamier 1977; White and Fisher 1989), Lichtmikroskopie (LaVail 1976), Fluoreszenzmikroskopie (McLaren, Inana et al. 1993; Hall, Burgess et al. 1996) oder Durchflusszytometrie (Miceli, Liles et al. 1994; Kennedy, Rakoczy et al. 1996; Miceli, Newsome et al. 1997; Karl, Kroeger et al. 2008). Die Messung der Phagozytose erfolgt häufig über Fluoreszenzquantifizierung. Es wurden indirekte Assays beschrieben, wo den RPE Zellen unbehandelte OS zugeführt wurden, und in einem zweiten Schritt die Anzahl gebundener oder aufgenommener OS durch Färbung mit einem Rhodopsin detektierenden Antikörper erfolgte (Chaitin, Hall et al. 1983; Colley and Hall 1986; Hall, Burgess et al. 1996; Finnemann, Bonilha et al. 1997; Feng, Yasumura et al. 2002; Feng, Zheng et al. 2003). Eine weitere häufig verwendete Technik besteht in der direkten Kopplung der OS mit einem Fluoreszenzfarbstoff (McLaren, Inana et al. 1993; Finnemann, Bonilha et al. 1997; Lin and Clegg 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein solcher Assay gewählt, bei dem die OS mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurden, und somit ein direkter Nachweis möglich ist. Die Auswertung erfolgte nach mehrstündiger Inkubation der Zellen mit OS, gegebenenfalls unter Anwesenheit der jeweiligen Ionenkanalblocker im Medium, durch ein Fluoreszenz Mikroplatten-Lesegerät. Die ermittelten Fluoreszenzwerte pro Well der Zellkulturplatte spiegeln im Wesentlichen die vom RPE aufgenommenen OS wieder, da vor der Messung mit mehreren Waschschritten lose angebundene OS entfernt wurden.

Die hier verwendete Methode stellt ein valides Modell dar, um die funktionelle Beteiligung von $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} Kanälen, TRP Kanälen, BK K^+ Kanälen und Bestrophin-1 an der Phagozytose zu testen. Gewebeausgangsmaterial zur Isolation der porcinen RPE Zellen steht im Vergleich zu Spezies wie *Mus musculus* in weitaus größerer Menge zur Verfügung. Die Kurzzeitkultur bietet aber vor allem den Vorzug einer stabilen endogenen Expression von Bestrophin-1, welche gleichzeitig einen Marker für die gute allgemeine Differenzierung dieser RPE Zellen darstellt.

Die Verwendung von Zelllinien ermöglicht den Ausschluss bestimmter Variablen im Assay, wie beispielsweise Subtypen, da morphologisch homologe Zellen eingesetzt werden, die in großer Menge zur Verfügung stehen, und die sich im gleichen Differenzierungsstadium befinden. Allerdings haben die Ergebnisse aus den Zelllinien nur beschränkt Gültigkeit. Die Verwendung der kurzzeitkultivierten porcinen Zellen bietet gegenüber Zelllinien den Vorteil, dass die Zellen noch weitestgehend Eigenschaften der primären Zellen tragen. Die RPE Zelle ist polar organisiert mit apikalen Mikrovilli, basaler Lamina und lateralen tight junctions, die sowohl den parazellulären Transport regulieren, als auch eine strukturelle Abgrenzung zwischen apikalen und basolateralen Bereich darstellen.

In Kulturen primärer RPE Zellen wurden aufgrund heterogener Morphologie polygonale oder spindelförmige Zellsubgruppen beschrieben, die sich in unterschiedlichen Differenzierungsstadien befinden, und sich hinsichtlich ihrer Adhäsion, der Zelloberflächenexpression von $\alpha_v\beta_5$ Integrin, oder ihrer Phagozytoseleistung unterscheiden (McKay, Burke et al. 1994; McLaren 1996; Miceli and Newsome 1996; Miceli, Newsome et al. 1997). Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturen primärer RPE Zellen wirken morphologisch homogen, zeigen die hexagonale Zellform, und eine große Zahl an Melanosomen.

Primäre Zellen in Kultur verändern ihre speziellen gewebespezifischen Charakteristika, da sich für sie viele Umgebungseigenschaften ändern (Feng, Zheng et al. 2003). Ein wichtiger Faktor ist dabei die Zelldichte. Normalerweise wird eine Proliferation eingeleitet, wenn Kontaktinhibition fehlt. Deshalb war es für die Kulturen sehr wichtig, dass die Zellen in großer Dichte von 1×10^6 pro ml ausgesät wurden, und möglichst früh (48 h) nach Überführung in Kultur verwendet wurden, ohne dass sie in Kultur eine Zellteilung durchlaufen mussten. Wenn Zellen sehr dicht ausgesät werden, besteht die Möglichkeit, dass sich einige Zell-Zellkontakte wie Desmosomen

und Adhäsionsverbindungen wieder bilden, und die Zellen als ein funktionelles Monolayer zusammenarbeiten. Ein weiterer wichtiger Punkt sind wachstumsstimulierende Faktoren im Kulturmedium, die von zelleigenen Rezeptoren erkannt werden, und Proliferation einleiten. Deshalb wurden für die Zellen mit 5% FKS im Medium serumreduzierte Bedingungen gewählt, um den Prozess der Proliferation zu verlangsamen.

Die OS Phagozytose ist ein spezifischer, durch mehrere Zelloberflächenrezeptoren und deren Liganden vermittelter Prozess. Die OS stellen den physiologischen Reiz am RPE zur Phagozytose dar, es entspricht dabei weitestgehend der in vivo Situation (Mayerson and Hall 1986). Häufig verwendete Latex beads aktivieren somit einen völlig anderen unspezifischen Mechanismus der Phagozytose (Edwards and Szamier 1977; Heth and Schmidt 1991; Finnemann, Bonilha et al. 1997). Die Verwendung von kryokonservierten OS ist eine gängige Methode. Dabei sind die Präparationen sehr heterogen und enthalten Partikel verschiedener Größen, von kompletten OS bis hin zu kleinen Fragmenten. Bei der Phagozytose in vivo werden dem RPE nur kleine terminale Abschnürungen, nicht ganze OS, zur Phagozytose angeboten. In der humanen Fovea ist eine RPE Zelle ca. 24 Zapfen exponiert, die mehrere OS-Pakete abschnüren (Gao and Hollyfield 1992). Dabei liegen die OS in Photorezeptormatrix eingebettet, eng benachbart zu den RPE Mikrovilli. In Zellkultur dagegen werden die isolierten OS als Suspension in Medium einfach zu den Zellen dazugegeben. So könnte die Anbindung in Kultur deutlich unterschiedlich sein zur in vivo Situation. Im Zellkulturassay wird den RPE Zellen eine heterogene Mischung von Partikeln angeboten, die durch die Isolationsprozedur verändert sein können. Zur Bindung an die Integrinrezeptoren der RPE Zelle wird beispielsweise MFG-E8 als Ligand benötigt, eine Aktivierung der MerTK setzt das Vorhandensein der Liganden Gas6 und ProteinS voraus.

In der Literatur sind viele Arbeiten zur Kinetik der Phagozytose kultivierter RPE Zellen zu finden. Dabei zeigen sowohl Studien von verschiedenen primären RPE Zellen als auch von RPE Zelllinien, eine vergleichbare Kinetik des Prozesses (Kennedy, Rakoczy et al. 1994; Kennedy, Rakoczy et al. 1996; Finnemann, Bonilha et al. 1997; Qin and Rodrigues 2012). Beschrieben wird dabei eine 30 minütige bis 1 stündige Anfangsphase, je nach verwendeten Zellen, in der wenige OS gebunden oder aufgenommen wurden. Dies könnte die Zeit der Sedimentation der OS auf die

Zelloberfläche der RPE Zellen sein. Es könnten aber auch Veränderungen in der Membran zur Vorbereitung der OS Aufnahme in diesem Zeitraum stattfinden. Nach 30 min wird schon eine erste Aufnahme beobachtet (Chaitin, Hall et al. 1983). In dieser Zeit sind mehr OS gebunden als aufgenommen. Danach folgt eine Phase mit einem starken Anstieg der OS Aufnahme, die zwischen 2 und 6 Stunden andauern kann. Hier steigt die Zahl der angebundenen OS nur langsam, was dadurch erklärbar ist, dass die Aufnahme sehr schnell passiert, wenn die OS erstmal an der Membran gebunden sind (Chaitin, Hall et al. 1983). Danach wird eine Plateauphase erreicht, in der die Aufnahme nur noch wenig zunimmt (Mayerson and Hall 1986). Diese Phase kann, je nach verwendeten Zellen, nach 5 h, oder auch erst nach mehr als 12 h beginnen (Kennedy, Rakoczy et al. 1996).

Die an kurzzeitkultivierten primären porcinen RPE im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten sind mit den Literaturangaben vergleichbar. Bereits nach 30min wurde die erste Phagozytose der Zellen detektiert. Nach 2, 5 oder 8 Stunden kam es dann zu einem starken Anstieg der Aufnahme, der sich bis zum Zeitpunkt 14 h noch weiter fortsetzte. Mit der für weitere Experimente gewählten Inkubationszeit von 5 Stunden wurde ein Zeitpunkt im Bereich der stark ansteigenden Aufnahme der OS gewählt, und die eingesetzte Konzentration an OS orientierte sich an mittleren Werten aus der Literatur. In den hier durchgeführten Experimenten konnte somit zeitabhängig und konzentrationsabhängig eine Steigerung der Phagozytose beobachtet werden. Es stand somit ein valides Modell zur Untersuchung der Phagozytose zur Verfügung.

4.1.2 Expression von $\text{Ca}_v1.3$, Bestrophin-1 und BK Kanälen in porcinen RPE Zellen

In den kurzzeitkultivierten porcinen RPE Zellen konnte die endogene Proteinexpression von $\text{Ca}_v1.3$, BK und Bestrophin-1 mittels immunozytochemischer Färbungen nachgewiesen werden. Hier zeigte sich ein punktuell Expressionmuster von $\text{Ca}_v1.3 \alpha1$ und BKslo1 porenbildenden Untereinheiten, welches beispielsweise auch für chromaffine Zellen der Nebennieren, oder Haarzellen im Innenohr beschrieben wurde (Engel, Braig et al. 2006; Vandael, Marcantoni et al. 2010). Die verwendeten Antikörper waren auf ihre Spezifität in

Ca_v1.3^{-/-} und BK^{-/-} Gewebe getestet (Sausbier, Sausbier et al. 2006). Dabei waren die drei Kanäle sowohl bei für kurze Zeit auf Deckgläschen semi-polarisiert kultivierten Zellen, als auch bei auf Zellfiltern polarisiert gezüchteten Zellen, die mit einem transepithelialen Widerstand von mehr als 400 Ohm·cm² sehr stark den Bedingungen der in vivo Situation gleichen, vorhanden.

Arbeiten mehrerer Gruppen zu spannungabhängigen Ca²⁺ Kanälen im RPE belegen, dass L-Typ Ca²⁺ Kanäle in kultivierten oder frisch isolierten primären RPE Zellen vorhanden und aktivierbar sind (Ueda and Steinberg 1993; Strauss and Wienrich 1994; Ueda and Steinberg 1995; Strauss, Mergler et al. 1997; Strauss, Buss et al. 2000; Rosenthal and Strauss 2002; Rosenthal, Malek et al. 2005; Rosenthal, Bakall et al. 2006; Wollmann, Lenzner et al. 2006; Rosenthal, Heimann et al. 2007; Wu, Marmorstein et al. 2007; Wimmers, Coeppicus et al. 2008; Wimmers, Halsband et al. 2008). Im Mausmodell wurde belegt, dass die Aktivität von L-Typ Kanälen im RPE durch die systemische Gabe von Dihydropyridinen (DHP) reduziert werden kann. Veränderungen des „Lichtanstiegs“ (LP) im DC-ERG, einem Signal das vom RPE generiert wird, belegen eine Funktion der Kanäle im RPE (Marmorstein, Wu et al. 2006). Auch Ca_v1.3^{-/-} knock-out Mäuse zeigen den signifikant verkleinerten LP (Wu, Marmorstein et al. 2007). Expressionsstudien belegen auf RNA- und Proteinebene Ca_v1.3 L-Typ Ca²⁺ Kanäle in frisch isolierten humanen RPE Zellen und der ARPE19 Zelllinie (Rosenthal, Heimann et al. 2007; Wimmers, Coeppicus et al. 2008).

Die Expression von BK Kanälen wurde ebenfalls in frisch isolierten humanen RPEs und in Zelllinien gezeigt (Wimmers, Halsband et al. 2008). Auch die Aktivität des Kanals wurde in ARPE19 Zellen, humanem und caninem RPE nachgewiesen (Sheu and Wu 2003; Sheu, Wu et al. 2004; Sheu, Wu et al. 2005; Sheu, Bee et al. 2008; Wimmers, Halsband et al. 2008). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach 48 Stunden in Zellkultur eine deutliche Menge an endogen exprimierten Bestrophin-1 Protein in den RPE Zellen vorkommt. Darin besteht der deutliche Vorteil der porcinen Zellen, da in RPE Zelllinien wie ARPE19 und RPE-J kein Bestrophin-1 Protein vorzufinden ist (Hartzell, Qu et al. 2008).

4.1.3 Bestrophin-1

4.1.3.1 Subzelluläre Lokalisation von Bestrophin-1 im RPE

Bestrophin-1 ist das Protein, welches bei der Best'schen vitelliformen Makula dystrophie, einer vererbten Degenerationen der Retina, verändert ist. Ein Verständnis dafür welche Funktion Bestrophin-1 erfüllt, und wie Mutationen in Bestrophin-1 zur Entstehung der Erkrankung führen, setzt Kenntnisse über gewebsspezifische Expression und Lokalisation in der Zelle voraus. In dieser Arbeit wurden Sucroседichtegradienten Zentrifugationen von frisch isolierten porcinen RPE Zellen durchgeführt, um die Lokalisation von Bestrophin-1 zu klären.

Nach mehreren Zentrifugationsschritten kamen 3 Pellets in die weitere Analyse, wo sie mittels Western Blot auf ihre beinhalteten Proteine hin untersucht wurden. Das initiale Pellet (PM) wies eine Anreicherung des Plasmamembranproteins β -Catenin auf. In dieser Fraktion lag kein Bestrophin-1, und nur eine sehr geringe Menge des intrazellulären Cl^- Kanals CLC-3 oder Myosin7A vor. Aus dem verbliebenen initialen Überstand wurde ein zweites Pellet (LSP) generiert, was eine Anreicherung des ER Proteins CLC-3 und von Myosin7 aufwies. Dieses Pellet enthielt auch sehr viel Bestrophin-1. Ein aus dem verbliebenen Überstand weiter generiertes Pellet (HSP) beinhaltete eine noch größere Menge an Myosin7A und CLC3. Das HSP Pellet wies auch eine noch höhere Konzentration von Bestrophin-1 auf. Fraktionen, die mit zytosolischen vesikulären Membranproteinen angereichert waren, zeigten auch eine Anreicherung an Bestrophin-1 auf.

Ein großer Vorteil der in dieser Arbeit durchgeführten Studien besteht in der Verwendung frisch isolierter porciner RPE Zellen, welche im Gegensatz zu RPE Zelllinien wie RPE-J oder ARPE19 endogen exprimiertes Bestrophin-1 Protein enthalten. In der Literatur finden sich sehr widersprüchliche Angaben zur subzellulären Lokalisation von Bestrophin-1, wobei die Untersuchungen weitestgehend anhand von Überexpression in Zelllinien durchgeführt wurden. Bei dieser Methode kann es leicht zur Artefaktbildung kommen (Clapham 1998; Jentsch, Stein et al. 2002). Es besteht die Gefahr, dass das Übermaß an exprimiertem Protein fälschlicherweise in der Zellmembran auftaucht, oder im Transportprozess stecken bleiben, und der vorgetäuschte Eindruck des intrazellulären Vorkommens entsteht.

Bestrophin-1 Expression wurde erstmals in der basolateralen Membran des RPE beschrieben (Marmorstein, Marmorstein et al. 2000). Mit Hilfe von Zelloberflächenbiotinylierung wurde in Überexpressionstudien in den Zelllinien HEK293 und RPE-J eine Lokalisation von Bestrophin-1 in der Zellmembran beobachtet (Marmorstein, Marmorstein et al. 2000; Fischmeister and Hartzell 2005). Andere Gruppen zeigten, dass humanes Bestrophin-1 in Überexpression in HEK293 Zellen einerseits in der Plasmamembran vorkommt, der Großteil des Proteins aber in intrazellulären Membranen vorlag (Tsunenari, Sun et al. 2003; Stanton, Goldberg et al. 2006). Dabei wurde von einer Akkumulation in cytosolischen Vesikeln und von perinucleären Aggregaten berichtet. In humanen Atemwegs-Epithelzellen wurde immunhistochemisch eine Ko-lokalisierung von endogenem Bestrophin-1 mit den ER Proteinen Calreticulin und Calnexin gefunden (Barro-Soria, Aldehni et al. 2009). Weiterhin konnte in HEK 293 Zellen mittels Überexpressionsstudien von Bestrophin-1 und Stim1 eine Ko-lokalisierung und Ko-immunopräzipitation mit Stim1, dem ER Ca^{2+} Sensor, gezeigt werden (Barro-Soria, Aldehni et al. 2009).

In immunhistochemischen Arbeiten unserer Gruppe mit Hilfe konfokaler Mikroskopie und Ko-färbungen mit den Zellmembran Proteinen β -Catenin und Cadherin wurde gezeigt, dass ein Teil von Bestrophin-1 in der Zellmembran lokalisiert ist, ein Großteil jedoch keine Ko-lokalisierung mit Proteinen der Zellmembran aufweist (Neussert, Muller et al. 2010). Dies steht im Einklang mit den mittels differentieller Zentrifugation erzielten Ergebnissen, wonach Bestrophin-1 in den gleichen Fraktionen wie Clc3, ein typischer ER Cl^- Kanal, gefunden wurde. Ein großer Anteil an Bestrophin-1 scheint sich daher in zytosolischen Membranen, in Regionen nahe der Plasmamembran, zu befinden. Hier trägt es wahrscheinlich in seiner Rolle als Cl^- Kanal zum Ladungsausgleich bei der Beladung der ER Ca^{2+} Speicher mit Ca^{2+} bei.

4.1.3.2 Expression purinerger P2Y Rezeptoren in *Best-1*^{-/-} RPE

Endogen exprimiertes Bestrophin-1 beeinflusst die Ca^{2+} Homöostase in RPE Zellen (Neussert, Muller et al. 2010). Dies konnte anhand von ATP vermittelter Stimulation purinerger P2Y Rezeptoren untersucht werden. Dabei führt ATP sowohl in RPE Zellen von *Best1*^{+/+} als auch von *Best1*^{-/-} Mäusen zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dies erfolgt aufgrund einer initiierten intrazellulären Signalkaskade, wo über Phospholipase C Aktivierung und die Bildung von IP_3 nachfolgend Ca^{2+} aus den IP_3 sensitiven ER freigesetzt wird (Berridge, Bootman et al. 2003). Um auszuschließen, dass die Unterschiede in der Kinetik ATP induzierter Ca^{2+} Erhöhungen zwischen den Genotypen auf die Aktivierung verschiedener P2Y Rezeptoren zurückzuführen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit das Expressionsprofil von P2Y Rezeptoren in kultivierten RPE Zellen untersucht. Sowohl in Kulturen von *Best1*^{+/+}, als auch von *Best1*^{-/-} Zellen wurde die Expression von P2Y 1, 2, 4, 6 beobachtet. Es gab keinen Unterschied in der Expressionsrate der Rezeptoren zwischen den Genotypen. Die Defizite in der ATP induzierten Ca^{2+} Freisetzung der *Best1*^{-/-} Zellen sind einzig auf die Rolle von Bestrophin-1 zurückzuführen, und sind durch seine Funktion als Cl^- leitender Kanal, der durch die Bereitstellung von negativ geladenen Ionen eine Aufnahme von Ca^{2+} in zytosolische Speicher ermöglicht, erklärbar (Barro-Soria, Aldehni et al. 2009; Neussert, Muller et al. 2010).

Purinerge Signalwege sind in der Kommunikation zwischen RPE und Photorezeptoren wichtig (Wimmers, Karl et al. 2007). Über P1 Rezeptoren wird die RPE Phagozytose moduliert (Mitchell and Reigada 2008). Über Stimulation von A2 Rezeptoren durch Adenosin kommt es zu einer Reduktion der OS Phagozytose Rate (Gregory, Abrams et al. 1994). Die am Morgen kurz nach Beginn der Lichtphase beobachtbare erhöhte Phagozytoseaktivität könnte dadurch erklärbar sein, dass die lichtabhängige Freisetzung von Epinephrin, zu einer geringeren ecto-5'-Nucleotidaseaktivität führt. Damit steht eine geringere Adenosin Konzentration zur Aktivierung der A2 Rezeptoren zur Verfügung, was eine erhöhte Phagozytose nach Lichteinschalten ermöglicht (Mitchell 2001; Reigada, Zhang et al. 2006; Mitchell and Reigada 2008).

4.1.3.3 Bestrophin-1

Ein Merkmal der Best'schen Vitelliformen Makuladegeneration sind frühzeitige Akkumulationen von Lipofuszin im RPE (Weingeist, Kobrin et al. 1982; Mullins, Oh et al. 2005; Bakall, Radu et al. 2007). Im Krankheitsmechanismus könnten Mutationen des Bestrophin-1 Proteins möglicherweise Veränderungen im Prozess der OS Phagozytose hervorrufen, was zu vermehrten Ablagerungen des autofluoreszenten Materials führen könnte. Um nun zu klären, ob Bestrophin-1 einen Einfluss auf die Phagozytose im RPE hat, wurden Phagozytose in vitro Experimente durchgeführt. Hierbei wurde die in porcinen RPE Zellen vorhandene Expression endogenem Bestrophin-1 Proteins mittels siRNA reduziert. Dabei führte der siRNA knock-down von Bestrophin-1 Protein zu einer erhöhten Phagozytoserate. Der Bestrophin-1 Proteinverlust in der Zelle entspricht zwar nicht der Krankheitssituation im Patienten, da jedoch *BEST1* Mutationen zum Funktionsverlust des Proteins führen, kann von einem Einfluss des Proteins auf die Phagozytose ausgegangen werden.

Bestrophin-1 vermittelt wahrscheinlich eine kombinierte und abgestimmte Reaktion der Ca^{2+} Freisetzung zwischen ER Ca^{2+} Speichern und L-Typ Kanälen (Rosenthal, Bakall et al. 2006; Zhang, Stanton et al. 2010). Das Protein fungiert einerseits als Cl^- Kanal des ER, wobei Bestrophin-1 durch den Transport von Cl^- Ionen in ER Ca^{2+} Speicher als Ladungsausgleich für eine korrekte Beladung mit Ca^{2+} Ionen oder an der Ca^{2+} Freisetzung aus dem ER beteiligt ist (Barro-Soria, Aldehni et al. 2009; Neussert, Muller et al. 2010). Wenn mutantes Bestrophin-1 Protein also seine Funktion nicht mehr hundertprozentig wahrnehmen kann, könnte die nachfolgend an eine MerTK Aktivierung über den IP_3 Signalweg induzierte Ca^{2+} Freisetzung aus dem ER gestört sein (Heth and Marescalchi 1994). Andererseits wurde gezeigt, dass Bestrophin-1 in den SOCE des RPE involviert ist (unveröffentlichte Daten). Die Reduktion oder der Verlust von Bestrophin-1 könnte so zu einer verminderten SOCE Aktivierung führen und damit Veränderungen in der Regulation der Phagozytose verursachen. Diese Hypothese wurde im weiteren Verlauf der Arbeit überprüft.

Bestrophin-1 reguliert $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Kanäle (Rosenthal, Bakall et al. 2006; Reichhart, Milenkovic et al. 2010). In Überexpressionsstudien wurde gezeigt, dass Bestrophin-1 einen direkten Interaktionspartner von $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Kanälen im RPE darstellt. Dabei moduliert Bestrophin-1 L-Typ Kanäle des RPE über eine direkte Interaktion zwischen prolin-reicher Domäne und SH3 Domäne der β -Untereinheit der L-Typ Kanäle

(Reichhart, Milenkovic et al. 2010; Milenkovic, Krejcova et al. 2011). Eine gestörte Interaktion verändert die $\text{Ca}_v1.3$ Ströme. Die pharmakologische Blockierung der L-Typ Ca^{2+} Kanäle führte im in vitro Experiment zu einer Verminderung der Phagozytose. Da Bestrophin-1 in elektrophysiologischen Analysen $\text{Ca}_v1.3$ Ströme verringert ist zu erwarten, dass im Bestrophin-1 knock-down ein gegenteiliger Effekt zum Tragen kommt. Eine fehlende Suppression der Kanalströme durch das Protein mündet in einem erhöhten Ca^{2+} Einstrom und damit einer erhöhten Phagozytose. Diese Funktion kann für die Phagozytose von großer Bedeutung sein.

4.1.4 Ca^{2+} Kanäle

4.1.4.1 L-Typ Ca^{2+} Kanäle

$\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Kanäle stehen in direkter Interaktion mit Bestrophin-1. Dabei moduliert Bestrophin-1 $\text{Ca}_v1.3$ Ströme, was über eine verminderte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einen regulatorischen Einfluss von L-Typ Kanälen auf die Phagozytose belegt. In weiteren Experimenten sollte nun überprüft werden, ob sich in den primären porcinen RPE Zellen über pharmakologische Modulation eine Beteiligung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen an der Regulation der Phagozytose nachweisen lässt. Die L-Typ Kanäle werden durch ihre Sensitivität gegenüber Dihydropyridinen (DHP) identifiziert (Striessnig 1999; Catterall, Striessnig et al. 2003). Diese Derivate binden an die extrazelluläre DHP-Bindestelle an der Porenuntereinheit der Kanäle. Der Einsatz von (+)-BayK8644 führt bis zu einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ zu einer spezifischen Blockade der Kanäle, wogegen der DHP L-Typ Kanal Öffner (-)-BayK8644 den offenen Zustand des Kanals verlängert (Nowycky, Fox et al. 1985). Die Phagozytose wurde durch L-Typ Kanal Blocker reduziert, kann aber nicht durch Kanalöffner moduliert werden.

Die in dieser Arbeit beobachtete relativ niedrige, aber signifikante Reduktion der Phagozytose bei Verwendung von (+)-BayK8644 um ca. 10 % deutet auf eine geringe Beeinflussung des Prozesses durch L-Typ Kanäle hin. In der SV40-RPE Zelllinie dagegen wurde konzentrationsabhängig eine starke Inhibition der Phagozytose (bis zu 51% in der Anbindung, bis zu 56% in der Aufnahme) mittels Nifedipin Blockierung gezeigt (Karl, Kroeger et al. 2008). Ein möglicher Grund für diese Unterschiede könnte die in der Zelllinie verstärkte src-Kinase Aktivität sein. Da src-Kinase L-Typ Kanäle aktiviert, wäre somit ein erhöhtes Ausgangsniveau an L-Typ

Kanalaktivität gegeben, und die Blockierung mittels Nifedipin könnte so einen stärkeren Effekt zeigen (Strauss, Buss et al. 2000). In der oben genannten Publikation wurde jedoch auch eine andere Messmethode verwendet (Karl, Kroeger et al. 2008). Dabei erfolgte die Markierung der OS mittels eines pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes. Unter Verwendung extrazellulärer Lösungen unterschiedlicher pH Werte war eine Unterscheidung zwischen angebundenen und aufgenommenen OS möglich, bzw. die Messungen erfolgten teilweise mittels Durchflusszytometrie. Anbindung und Aufnahme waren durch Nifedipin nachweislich reduziert. Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode beinhaltet die Entfernung ungebundener OS durch mehrere Waschschriffe mit PBS, unter mechanischer Bewegung. Da die Phagozytose durch L-Typ Kanal Blockierung reduziert ist, und die gemessenen Fluoreszenzwerte im Wesentlichen der Menge an aufgenommenen Partikeln entsprechen, könnte aber auch bereits der erste Schritt der Anbindung beeinträchtigt sein. Dieser Effekt wäre vergleichbar mit dem der $\beta 5$ -Integrin defizienten RPE Zellen in Kultur. Hier ist die Anbindung gestört, nachfolgend ist die OS Aufnahme verringert, und eine verminderte Anzahl an phagozytierten OS wird beobachtet (Nandrot, Kim et al. 2004).

Aus der genannten Publikation und der vorliegenden Arbeit geht unter Verwendung unterschiedlicher Methoden somit übereinstimmend hervor, dass L-Typ Ca^{2+} Kanäle, die sowohl für Nifedipine als auch für (+)-BayK8644 sensitiv sind, am Prozess der Phagozytose beteiligt sind. Dennoch kommt es in beiden Experimenten übereinstimmend zu keiner vollständigen Beeinträchtigung der Phagozytoseleistung. Dies dürfte entweder darauf zurückzuführen sein, dass endogen exprimierte L-Typ Kanäle, ob im RPE oder in den Haarzellen des Innenohres, durch (+)-BayK8644 generell nur zu 50% gehemmt werden können, oder der Einstrom von Ca^{2+} durch die Kanäle über die Zellmembran nur von bedingter Wichtigkeit für den Prozess ist (Knirsch, Brandt et al. 2007). Die Abwesenheit des zirkadianen Rhythmus im Zellkulturexperiment könnte ebenfalls ein Grund für den relativ schwachen Effekt sein. Außerdem können auch noch andere Membrankanäle für den benötigten Einstrom von Bedeutung sein, wie im Verlauf dieser Arbeit weiter untersucht wurde.

Dass funktionelle Kanälen aus der Familie spannungsabhängiger Ca^{2+} Kanäle im intakten Auge vorhanden sind, ist durch die systemische Gabe von DHP nachweisbar. Eine Verabreichung von Nimodipin führt in Mensch, Ratte und Maus zu

Veränderungen des „Lichtanstiegs“ (LP) im DC-ERG, einem Signal das vom RPE generiert wird (Marmorstein, Wu et al. 2006; Rosenthal, Bakall et al. 2006; Constable 2011). Die Funktionalität von $\text{Ca}_v1.3$ Untereinheiten im RPE wurde durch einen signifikant verkleinerten LP der $\text{Ca}_v1.3$ -/- knock-out Maus belegt (Wu, Marmorstein et al. 2007). In elektrophysiologischen Untersuchungen kultivierter RPE Zellen lassen sich von den L-Typ Ca^{2+} Kanälen auf Funktionsebene nur $\text{Ca}_v1.3$ Ströme nachweisen. Sie sind durch eine niedrige DHP Sensitivität, die spannungsabhängige Aktivierung im sehr negativen Spannungsbereich, und die schnelle zeitabhängige Aktivierung charakterisiert (Koschak, Reimer et al. 2001; Michna, Knirsch et al. 2003). In Studien zur Regulation der L-Typ Kanäle wurde gezeigt, dass sie maßgeblich zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beitragen, obwohl die in RPE Zellen vorhandenen Veränderungen im Membranpotenzial der Zelle nicht groß genug sind um spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle zu aktivieren. Dies ist möglich durch die phosphorylierungsabhängige Aktivierung der Kanäle. Sie führt dazu, dass sich die spannungsabhängige Aktivierung der Kanäle hin zu einem mehr negativen Potenzial, näher am Ruhemembranpotenzial der RPE Zellen liegenden Potential, verschiebt (Mergler and Strauss 2002; Rosenthal, Heimann et al. 2007).

Die Phagozytose von OS ist ein rezeptorvermittelter Prozess. Ein wichtiger Rezeptor, Protein-Tyrosin Kinase Mer, ist für die Aufnahme der Partikel in die RPE Zelle unverzichtbar, wobei MerTK defiziente RPE Zellen nicht mehr in der Lage sind OS aufzunehmen, OS aber noch binden (Chaitin, Hall et al. 1983; Vollrath, Feng et al. 2001; Hall, Obin et al. 2005). Eine pharmakologische Blockade der L-Typ Ca^{2+} Kanäle verringert die MerTK regulierte Phagozytose (Karl, Kroeger et al. 2008). Src-Kinase spielt hier eine Rolle im Signalweg nachfolgend an die Rezeptortyrosinkinase-Aktivierung. Wie Experimente in SV40-RPE Zellen belegen, verhindert Src-Kinase Inhibition die Serumstimulierbarkeit der Phagozytose durch die im Serum enthaltenen Liganden für MerTK ProteinS und Gas6. Eine pharmakologische Blockade der L-Typ Ca^{2+} Kanäle führt in Makrophagen oder Zellen des Testis, wo MerTK als Rezeptortyrosinkinase in den Prozess involviert ist, zu einer Reduktion der Phagozytose (Mano and Puro 1990; Tokuda, Mano et al. 1992). Die L-Typ Kanal Aktivität scheint von einer inhibitorischen Funktion der MerTK moduliert zu werden, welche in MerTK defizienten RPE Zellen nicht mehr vorhanden ist, und daher in diesen Zellen eine erhöhte Kanalaktivität beobachtet wurde (Strauss, Stumpff et al. 1998).

Eine zweite für die OS Phagozytose wichtige Gruppe von Rezeptoren sind die $\alpha_v\beta_5$ Integrine, welche die Anbindung der OS Partikel ans RPE vermitteln. Im knock-out Modell weisen murine RPE Zellen ohne β_5 Integrin eine reduzierte OS Phagozytose auf, und der morgendliche Peak der Phagozytoseaktivität fehlt (Nandrot, Kim et al. 2004). Src-Kinase scheint nun das direkte Bindeglied zwischen OS Rezeptoren und L-Typ Ca^{2+} Kanal darzustellen (Finnemann, Bonilha et al. 1997; Mergler, Steinhausen et al. 1998; Strauss, Buss et al. 2000; Finnemann 2003). In RPE Zellen, wie auch in verschiedenen anderen Zelltypen, wird eine Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen durch Integrinrezeptor-Ligation beschrieben (Wu, Mogford et al. 1998; Gui, Wu et al. 2006). Src-Kinase Aktivierung ist in der Initiationsphase der Phagozytose nachfolgend an Stimulation von α_v -Integrinen im RPE zu beobachten (Nandrot, Kim et al. 2004). OS binden über RGD Motiv enthaltende Liganden an Integrinrezeptoren. Es wurde in ARPE19 Zellen gezeigt, dass α_v -Integrin Stimulation, L-Typ Kanal Ströme im RPE moduliert (Karl, Kroeger et al. 2008). Eine Deaktivierung von α_v -Integrin führte zu verringerter L-Typ Kanalaktivität, wogegen eine positive Stimulation mit Liganden zur Erhöhung der Kanalaktivität führte. RGD-Peptide, die spezifisch mit Integrinen interagieren, und die RPE Phagozytose in vitro verringern, haben einen deutlichen Effekt auf die L-Typ Kanal Aktivität.

4.1.4.2 Orai-1 und SOCE

In RPE Zellen findet durch Speicherentleerung aktivierter Ca^{2+} Einstrom (SOCE, engl. Sore operated C a^{2+} entry) statt (Cordeiro and Strauss 2010). Hierbei steht der Ca^{2+} Einstrom über geöffnete Orai-1 Kanäle der Zellmembran mit dem $\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$ Signalsystem der Zelle in Verbindung. Die räumlichen und zeitlichen Charakteristika von Ca^{2+} Signalen sind je nach Zelltyp, involvierten Rezeptoren und Aktivierungsstatus der Zellen sehr verschieden (Nunes, Demaurex et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob SOCE für die Phagozytose im RPE von Bedeutung ist, da bei Stimulation der RPE Zellen mit OS IP_3 als sekundärer Botenstoff generiert wird (Heth and Schmidt 1991). Der knock-down von Orai-1 führte in primären porcinen RPE-Zellen in vitro zu keiner Veränderung der Phagozytose des RPE.

Makrophagen von STIM-1 knock-out Mäusen zeigen dagegen eine Inhibition der IgG-abhängigen Aufnahme im Phagozytoseprozess (Braun, Gessner et al. 2009). In *Drosophila* wurde die Rolle von STIM-1 und Orai-1 in der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen-ähnliche S2 Zellen gezeigt (Cuttell, Vaughan et al. 2008). Auch in der Membran von Phagosomen neutrophiler Granulozyten wird vermutet, dass SOCE Aktivität zur Bildung der periphagosomalen erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ beiträgt (Lundqvist-Gustafsson, Gustafsson et al. 2000). In der Literatur fanden sich somit viele Hinweise auf eine Rolle von SOCE im Phagozytoseprozess (Steinckwich, Schenten et al. 2011). Dies konnte so für das RPE nicht bestätigt werden.

4.1.4.3 TRP Kanäle vom Vanilloid-Rezeptor Subtyp

Die Untersuchungen weisen auf eine Rolle von TRPV Anionen Kanälen in der Generierung intrazellulärer Ca^{2+} Signale zur Regulation der Phagozytose hin. Eine direkte Blockierung von TRPV-Kanälen im RPE durch Ruthenium Rot (RuR) bewirkte eine Verminderung der Gesamtphagozytose in Experimenten *in vitro*, wogegen 100 μ M 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB), was zur Aktivierung der Kanäle führt, eine Erhöhung bewirkte. RuR inhibiert alle TRPV Kanäle, ungeachtet der unterschiedlichen Subtypen (Clapham, Runnels et al. 2001). Die Wirkung von 2APB ist nicht einheitlich an allen TRP Kanälen. Während einige inhibiert werden, wirkt 2APB in hohen Konzentrationen aktivierend auf die im RPE exprimierten TRPV1, 2, 3 (Hu, Gu et al. 2004; Colton and Zhu 2007).

Eine Rolle von TRPV Kanälen in der Anbindungsphase der Phagozytose von Makrophagen wurde beschrieben. In TRPV2 defizienten Mäusen ist die Partikelbindung und Aufnahme beeinträchtigt (Link, Park et al. 2010). In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Bindung in Makrophagen, im Gegensatz zum RPE, Ca^{2+} unabhängig ist (Greenberg, el Khoury et al. 1991). In wildtyp Makrophagen ist die Partikelbindung nicht beeinträchtigt, wenn sich die Zellen in einer Ca^{2+} freien extrazellulären Lösung befinden, und auch intrazelluläres Ca^{2+} mittels BAPTA Chelatoren abgefangen wird (Link, Park et al. 2010). Die Autoren schlussfolgern, dass der Einstrom von Na^+ Ionen und die resultierende Depolarisation der Zellmembran, zur vermehrten Synthese von PI(4,5)P2 führt, und dadurch Aktin-depolymerisation und FcR clustering unterstützt. Die Autoren zeigen eine src-Kinase

und PI3-Kinase abhängige TRPV2 Rekrutierung zu den Phagosomen, welche auch in die Signaltransduktion der RPE Phagozytose involviert sind (Eliceiri, Puente et al. 2002; Law, Ling et al. 2009). Somit kontrollieren TRPV2 die Rate der Phagozytose von Makrophagen indirekt, wie dies auch für ihre Rolle in der RPE Phagozytose vorstellbar wäre. Da TRPV Ca^{2+} permeabel sind, wäre ebenso eine weitere Funktion von TRPV2 in der Regulation späterer Schritte des Phagozytoseprozesses durch lokale Ca^{2+} Signale denkbar. Diese Möglichkeit müsste erst noch untersucht werden, es bestehen aber einige Hinweise darauf. TRPV2 wurde in Makrophagen und J774 Zellen in Fraktionen früher Endosomen gefunden (Wainszelbaum, Proctor et al. 2006). Eine andere Gruppe konnte in HEK293 Zellen in vergrößerten frühen Endosomen Ströme mit einer TRPV2 Charakteristik messen (Saito, Hanson et al. 2007), und folgerte daher TRPV2 könnte an der Fusion von frühen Endosomen und deren Reifungsprozessen beteiligt sein.

Die Absorption von Licht führt zu einem Anstieg der Temperatur auf über 40°C im RPE/Choroid Komplex (Parver, Auker et al. 1980). In RPE Zellen wurde die hitzeinduzierte Aktivierung von TRPV Kanälen beobachtet (Cordeiro, Seyler et al. 2010). Der zirkadiane Rhythmus der Phagozytose besteht in absoluter Dunkelheit für mehrere Tage weiter, allerdings war die Anzahl an Phagosomen zum Zeitpunkt der vermeintlichen Peakaktivität deutlich niedriger als unter Lichteinfluss (LaVail 1976). Mit Beginn der Lichtphase könnten TRPV Kanäle vermehrt aktiviert werden, und möglicherweise nötig sein, um die volle Amplitude des Rhythmus aufrecht zu erhalten, die lichtvermittelt getriggert wird. Die pharmakologische Modulation der TRPV Kanäle liefert einen Anhaltspunkt für deren Beteiligung am Phagozytoseprozess im RPE. Um diese Ergebnisse auf die in vivo Situation zu übertragen, müssten jedoch weitere Untersuchungen im Tiermodell von TRPV2 knock-out Mäusen vorgenommen werden. Es wäre hier sehr interessant den Rhythmus im Phagozytoseprozess genauer zu untersuchen.

1.5 BK K⁺ Kanäle

Viele RPE Zellfunktionen werden durch Ca²⁺ Signale reguliert (Strauss 2005). Verschiedene Stimuli führen dabei zu Anstiegen der [Ca²⁺]_i, die durch eine Aktivierung von L-Typ Kanälen generiert werden. Beispielsweise führt der Wachstumsfaktor bFGF (engl. basic fibroblast growth factor) zu einer L-Typ Kanal Aktivierung, die für eine Ca²⁺-induzierte Sekretion von VEGF (engl. vascular endothelial growth factor) verantwortlich ist (Rosenthal, Malek et al. 2005). Die Zelle braucht somit Mechanismen zur Feinregulation der Ca²⁺ Signale, um diese Prozesse zu kontrollieren. Die Interaktion von BK und L-Typ Kanälen linearisiert das Verhältnis von Membranpotential zu [Ca²⁺]_i über einen größeren Potentialbereich. Zusätzlich wird die [Ca²⁺]_i durch Membrantransporter und Pumpen kontrolliert, die einen Ausstrom von Ca²⁺ aus dem Zytosol ermöglichen (Mangini, Haugh-Scheidt et al. 1997). Dieser Mechanismus ist aber wesentlich weniger effizient, und kann nur bedingt einem starken Einwärtsstrom von Ionen über die Kanäle entgegenwirken. Eine Beteiligung von BK Kanälen an der Terminierung von Ca²⁺ Signalen ist bekannt (Ghatta, Nimmagadda et al. 2006; Wimmers, Karl et al. 2007). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob der Ca²⁺ abhängige Prozess der Phagozytose auch durch die BK Kanalaktivität moduliert wird. Eine Blockierung von BK Kanälen durch Paxillin, einem mykogenem Indolalkaloid (Zeng, Gordon et al. 2008) , führte konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Phagozytose.

Erste Hinweise auf eine Komplexbildung zwischen BK und Ca_v1.3 stammen aus einer Arbeit, wo über Ko-immunoprecipitation eine Interaktion von BK α und den L-Typ Kanal α -Untereinheiten Ca_v1.2 und Ca_v1.3 gezeigt wurde (Grunnet 2004). Der molekulare Mechanismus, über den beide Kanäle in Verbindung stehen, wurde als eine direkte Kanal-Kanal Interaktion identifiziert (Berkefeld, Sailer et al. 2006). Die gebildeten BK-Ca_v Superkomplexe entstehen durch eine direkte Interaktion der porenbildenden α -Untereinheiten, vermutlich durch einen Kontakt zwischen Teilen ihrer Transmembrandomänen (Berkefeld, Fakler et al. 2010). „Ca²⁺ Nanodomänen“ sind für BK Kanäle sehr wichtig, den nur in engster Umgebung der Ca_v Kanäle wird eine solch hohe Ca²⁺ Konzentration im mikromolaren Bereich erreicht, wie sie zur BK Aktivierung benötigt wird. Andere Ca²⁺ abhängige Prozesse in der Zelle werden davon nicht beeinflusst. Die Aktivität von BK wird somit streng kontrolliert durch den Ca_v Interaktionspartner.

Im RPE wurde gezeigt, dass BK Kanäle durch einen über die Öffnung spannungsabhängiger L-Typ Ca^{2+} Kanäle vermittelten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert werden (Wimmers, Halsband et al. 2008). Die Autoren beobachteten nachfolgend einen negativen Kontrollmechanismus, indem der BK Strom zur Kontrolle der L-Typ Ca^{2+} Kanalaktivität beiträgt, und diese deaktiviert. Bei BK Blockierung kann der negative Rückkopplungsmechanismus von BK zur Terminierung der Ca_v Ströme nicht greifen. Es kommt allerdings nicht zu einer Steigerung der Ca_v abhängen Phagozytosefunktion. Diese direkte Kopplung scheint hier in der in vitro Phagozytose keine Rolle zu spielen. Denkbar wäre natürlich auch, dass die Zelle kompensatorisch andere Mechanismen benutzt, um sich vor einem erhöhten Ca^{2+} Einstrom zu schützen. Andererseits könnte in diesem Experiment auch der Effekt der positiven Rückkopplung auf TRP Kanäle zum Tragen kommen. Dadurch, dass keine starke Hyperpolarisation des Membranpotentials durch BK vorhanden ist, fehlt die zur Stabilisierung der $[\text{Ca}]_i$ Erhöhung notwendige Triebkraft für den Ca^{2+} Einstrom.

1.6 Modell zur Ionenkanalinteraktion in der Regulation der Phagozytose

Die in vitro gewonnenen Daten zeigen eine funktionelle Rolle der Kanäle TRP, $\text{Ca}_v1.3$, Bestrophin-1 und BK in der Regulation der Phagozytose. Sie wird durch die genannten Ionenkanäle unterstützt oder getriggert, indem sie entweder Regulatoren für Ca^{2+} Kanäle sind, selbst als Ca^{2+} Eintrittswege über die Zellmembran dienen, oder die treibende Kraft für den Ca^{2+} Einstrom regulieren.

Bestrophin-1 interagiert direkt mit $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Kanälen, indem es $\text{Ca}_v1.3$ Ströme verringert. Dies führt zu einer verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und reduzierten Phagozytose. BK Kanäle könnten nach den Erkenntnissen aus der in vitro Situation über zwei mögliche Wege den Einstrom von Ca^{2+} Ionen über die Zellmembran regulieren. Aktiviert durch einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, erfolgt über BK Kanäle ein K^+ Ausstrom aus der Zelle. Über eine Re/Hyperpolarisation des Membranpotentials nimmt dieser Einfluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Durch eine negative Rückkopplung auf L-Typ Kanäle besteht die Möglichkeit, dass die Repolarisation des Membranpotentials zur Deaktivierung von $\text{Ca}_v1.3$ Kanälen führt, deren Öffnungszeit verkürzt, und damit eine Terminierung des Ca^{2+} Einstroms bewirkt.

Die zweite Möglichkeit wäre ein positiver Rückkopplungsmechanismus von BK zur TRP Kanalaktivität. Die Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ durch Ca^{2+} Einstrom über die Membran hängen vom elektrochemischen Ca^{2+} Gradienten ab, der durch das Membranpotential bestimmt wird. TRP Kanäle ermöglichen den Einstrom positiv geladener Ionen wie Na^+ oder Ca^{2+} in die Zelle. Der Ca^{2+} Einstrom über TRPV könnte zur Ca^{2+} abhängigen Öffnung von BK führen, oder die durch Kationen Einstrom generierte Depolarisation der Zellmembran führt zur BK Öffnung. Die Depolarisation des Membranpotentials wird kompensiert durch die Aktivierung von Ca^{2+} abhängigen K^+ Kanälen. Sie leiten damit eine Membranhyperpolarisation ein, stabilisieren somit die Triebkraft für Ca^{2+} , und rufen damit eine Verlängerung der $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung hervor. Vorstellbar wäre auch, dass zu verschiedenen Tageszeitpunkten BK Kanäle unterschiedliche Aufgaben haben. So könnte am Morgen durch den positiven Rückkopplungsmechanismus ein verstärktes Ca^{2+} Signal zum Start der Phagozytose erzeugt werden, wogegen am Nachmittag der negative feed-back Mechanismus greift, um ein sicheres Abschalten der Phagozytose herbeizuführen. So beeinflussen BK Kanäle die Amplitude und Dauer von Ca^{2+} Signalen und nehmen somit einen Einfluss auf nachfolgende Signalwege in der Zellen, die durch Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst werden.

Weiterhin wäre es vorstellbar, dass beide Mechanismen miteinander interagieren. Die TRP Kanal induzierte Membrandepolarisation könnte als Trigger zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanäle dienen, und somit die treibende Kraft für den Ca^{2+} Eintritt über die Zellmembran darstellen. TRP sind wichtig für die Regulation der Aktivität von Ca_v Kanälen. Somit könnten TRP über ihren Einfluss auf Ca_v Kanäle an der Phagozytoseregulation beteiligt sein. Andererseits könnte auch die BK abhängige Hyperpolarisation das Membranpotential im Bereich der L-Typ Kanäle halten, und damit einer weiteren Depolarisation durch TRP Kanalaktivität entgegenwirken. Über dieses System kommt es zu einer Feinabstimmung des elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} .

Zur Interpretation der in vitro gewonnenen Ergebnisse muss beachtet werden, dass zur in vivo Situation ein großer Unterschied besteht. In Kultur fehlen Einflüsse durch einen zirkadianen Trigger, die zu einer koordiniert regulierten Expression der Ionenkanäle führt. Es ist also möglich, dass in vivo zu unterschiedlichen Tageszeiten verschiedene Mechanismen zum Tragen kommen. Die RPE Zellen in Kultur dagegen

befinden sich in einer Art „Mischstatus“, der zwischen Tag und Nachtprofil liegt. Deshalb kann möglicherweise der beobachtete Einfluss der einzelnen Mechanismen nicht so stark greifen und Unterschiede nicht so deutlich herausgearbeitet werden.

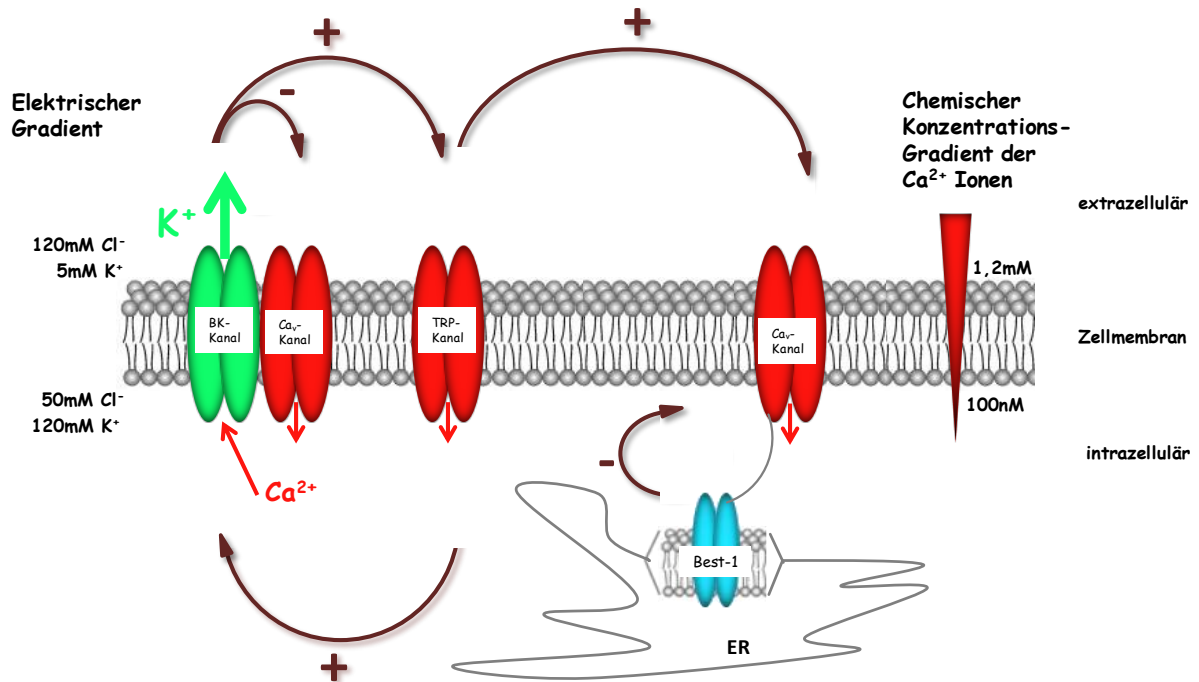


Abbildung 4.1: Model zur Interaktion der in die Regulation der Phagozytose involvierten Ionenkanäle.

4.2 Untersuchungen zur Beteiligung von Ionenkanälen an der Regulation der Phagozytose des RPE in vivo

In Phagozytose in vitro Experimenten kultivierter RPE-Zellen konnten mehrere an der Generierung und Modulation intrazellulärer Ca^{2+} Signale beteiligte Ionenkanäle identifiziert werden, die eine Rolle in der Regulation der Phagozytose spielen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde nun überprüft, ob zwei der Kandidaten, $\text{Ca}_v1.3$ und BK, Einfluss auf den rhythmisch ablaufenden Prozess der Phagozytose im Mausmodell haben.

Mit dem hier verwendeten Ansatz konnten Phagosomen im RPE unter Verwendung eines Rhodopsinepitope detektierenden Antikörpers fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebene Rhythmik der Phagozytose mit einer hohen Phagosomenzahl in den ersten zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase, und einer sehr niedrigen Zahl im Tagesverlauf, lies sich reproduzieren (LaVail 1976; Nandrot and Finnemann 2008). Mit dem Antikörper 1D4 von Molday wurden immer basolaterale Phagosomen detektiert. Der Prozess der Phagozytose beginnt mit der Partikelaufnahme an der apikalen Membran der polarisierten RPE Zelle. Phagosomen verbleiben nur kurze Zeit im apikalen und zentralen Teil der Zelle, werden zügig zur basolateralen Membran transportiert, und dort degradiert (Herman and Steinberg 1982). Der Antikörper 1D4 erkennt ein c-terminales Epitop von Rhodopsin, an der zytoplasmatischen Seite der Diskmembranen (Molday and MacKenzie 1983). Proteinmodifikationen durch Proteasen gehen einher mit Konformationsänderungen des Proteins. So ist anzunehmen, dass zum Zeitpunkt des fortgeschrittenen Verdaus das Epitop erst zugänglich wird. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte dagegen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu Transport und Reifung der Phagosomen im RPE eine Markierung früher Endosomen durch den verwendeten anti-Rhodopsin Antikörper (Seabra et al., unveröffentlicht). Dies würde für einen schnellen Transport der Phagosomen sprechen, so dass sich bereits 30 min nach Beginn der Lichtphase die meisten in der basolateralen Region der Zelle befinden.

4.2.1 Untersuchungen im Ca_v1.3^{-/-} und BK^{-/-} Mausmodell

Aus den durchgeführten Untersuchungen konnte übereinstimmend *in vitro* und *in vivo* ein Einfluss der BK und Ca_v1.3 Kanalaktivität auf die Regulation der rhythmisch ablaufenden Phagozytose nachgewiesen werden. In den Ca_v1.3 defizienten Tieren konnten mit einer leicht verringerten Phagosomenanzahl zum Zeitpunkt der Phagozytose Maximalaktivität und einer im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhten Menge an Phagosomen am Nachmittag, leichte, aber signifikante Veränderungen beobachtet werden. Dies steht in Übereinstimmung zu den *in vitro* Daten, in denen sich ein relativ kleiner Effekt der pharmakologischen Kanalblockierung zeigte. Auch in den BK knock-out Mäusen zeigten sich signifikante Unterschiede im rhythmischen Prozess. Am Morgen weisen knock-out Tiere eine hohe Phagozytoseaktivität auf, zum Zeitpunkt der Maximalaktivität zeigt sich jedoch eine geringere Anzahl an Phagosomen. Am Nachmittag liegt eine im Vergleich zu den Kontrolltieren niedrigere Menge an Phagosomen vor.

Ca_v1.3 Kanäle sind für die Ca²⁺ Homöostase des RPE und damit die Phagozytosefunktionen von großer Bedeutung. Knock-out Tiere sind nicht komplett defizient in ihrer RPE Phagozytose. Sie weisen keine groben Veränderungen der Retinastruktur oder einen Verlust von Neuronen in den nukleären Schichten auf, einzig eine morphologische Veränderung an der Photorezeptorsynapse wurde beschrieben (Busquet, Nguyen et al. 2010). Möglicherweise könnte im Ca_v1.3 knock-out Modell die Defizienz zumindest teilweise von Ca_v1.2 funktionell kompensiert werden, da beide Kanäle im RPE exprimiert sind. Bisher wurden jedoch keine Hinweise auf eine Hochregulation der Ca_v1.2 Expression im Ca_v1.3 knock-out Modell in der Retina beschrieben (Busquet, Nguyen et al. 2010). Für den direkten Mechanismus des Phagozytoseprozesses sind wohl die beschriebenen Rezeptoren und Moleküle wie α v β 5 Integrin, MerTK, FAK von entscheidender Bedeutung. Die Membrankanäle mit den von ihnen erzeugten zytosolischen Ca²⁺ Erhöhungen können auf die Phagozytose-Signalwege Einfluss nehmen. Über die Modulation einzelner Schritte in der Signalkette kann somit der zirkadiane Rhythmus bewirkt oder getriggert werden.

Ca_v1.3^{-/-} Mäuse zeigen eine Veränderung der zirkadianen Regulation der Körpertemperatur. Während morgens zum Zeitpunkt der erhöhten Temperatur beide Gruppen gleich sind, zeigen knock-out Tiere zu späteren Tageszeitpunkten eine

niedrigere Temperatur (Busquet, Nguyen et al. 2010). Erstaunlicherweise weisen die $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ Mäuse in Verhaltensversuchen jedoch einen normalen Tag-Nacht Rhythmus in ihrer spontanen homecaging Aktivität auf (Busquet, Nguyen et al. 2010).

Der Ca^{2+} Einstrom über $\text{Ca}_v1.3$ Kanäle ist an der Regulation der Phagozytose beteiligt. Eine mögliche Hypothese zur Erklärung der Befunde wäre, dass die Expression der $\text{Ca}_v1.3$ Kanäle im RPE an bestimmten Tageszeiten unterschiedlich stark ist. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression der Kanäle selbst einem zirkadianen Rhythmus folgt. Die $\alpha1$ Kanaluntereinheiten zeigen auf mRNA- und Protein-Ebene in Hühnchen Photorezeptoren und Fisch Bipolarzellen rhythmische Expressionlevel (Hull, Studholme et al. 2006; Ko, Liu et al. 2007; Ko, Jian et al. 2009; Ko, Shi et al. 2009). Ebenso wurde in Photorezeptorzellen eine höhere maximale Stromamplitude von L-Typ Kanälen um Mitternacht als mittags beobachtet (Hull, Studholme et al. 2006; Ko, Liu et al. 2007). Denkbar wäre, dass auch im RPE die Membranexpression einem zirkadianen Rhythmus folgt und so zu manchen Zeitpunkten ein Einfluss besteht, an anderen nicht.

Es fehlt bisher noch ein umfassendes Verständnis wie „molekulare Uhren“ und Ionenkanal-Rhythmen miteinander in Verbindung stehen. Bekannt ist, dass Oszillatoren über den Mechanismus einer direkten Kontrolle der Transkription und Translation von L-Typ und BK Ionenkanälen regulierend eingreifen (Pennartz, de Jeu et al. 2002). Ein rhythmischer Transport der Kanäle zur Zellmembran hin, und ein damit regulierter Ein- oder Ausbau aus der Membran wäre denkbar. Weitere Mechanismen könnten die posttranslational Modifikation wie Phosphorylierung, die Bindung von Kofaktoren, oder die Verteilung der Kanäle in der Membran darstellen.

Ein Beispiel wie Kanäle selbst in ihrer Rhythmik durch die Oszillatoren, dem zirkadianen output, beeinflusst werden, ist die Regulation spannungabhängiger Ca^{2+} Kanäle. Der MAPK-CaMKII Signalweg und der PI3 Kinase – Protein kinase B (Akt)Signalweg, tragen zur zirkadianen regulierten Funktionalität von L-Typ Kanälen bei, indem sie den Transport zur Plasmamembran, und den Einbau in die Membran aktivieren (Le Blanc, Mironneau et al. 2004; Ko, Jian et al. 2009; Ko, Shi et al. 2009). Andererseits führt der Ca^{2+} Einstrom über L-Typ Kanäle zu Veränderungen in Signalwegen, dem zirkadianen Input, die die Gene der Molekularen Uhren und nachfolgend cAMP Signalwege, die Gen- und Proteinexpression von AA-NAT

(Arylalkylamine *N*-acetyltransferase), einem Hauptenzym im Melatoninsyntheseweg und die Melatoninproduktion beeinflussen.

Aus Untersuchungen am $\text{Ca}_v1.3$ -/- Mausmodell gibt es Hinweise auf Modulationen von anderen grundlegenden zirkadianen Rhythmen. Vorgegeben werden solche Rhythmen in Physiologie oder Verhalten von Organismen durch biologische Uhren. Die molekulare Grundlage bildet dabei ein feedbackloop von Transkriptionsfaktoren (Tosini, Pozdeyev et al. 2008). Viele Gewebe besitzen eigene Uhren, die vom zentralen Rhythmusgeber im Gehirn (SCN) aufeinander abgestimmt, und an den Tag/Nacht Rhythmus der Umwelt angeglichen werden. Die Retina beinhaltet in unterschiedlichen retinalen Schichten, darunter Photorezeptoren oder Ganglienzellen, autonome zirkadiane Oszillatoren, die eine Anpassung an stark unterschiedliche Beleuchtungsverhältnisse zwischen Tag und Nacht ermöglichen (Guido, Garbarino-Pico et al. 2010). Sie besitzen alle bekannten Komponenten der molekularen Uhren, und sind damit in ihrem Einfluss auf die Modulation der Ionenkanalexpression völlig unabhängig vom SCN (Terman, Reme et al. 1993; Tosini and Menaker 1996).

Der L-Typ Ca^{2+} Kanal-Rhythmus ist funktionell wichtig für die zirkadiane Kontrolle der Melatoninsynthese (Ko, Shi et al. 2009). In vielen Vertebraten wird Melatonin von der Retina selbst synthetisiert und unter zirkadianer Kontrolle sezerniert, mit einem höheren Level in der Nacht als am Tag (Cahill and Besharse 1993; Ivanova and Iuvone 2003; Guido, Garbarino-Pico et al. 2010). Für die nächtlich erhöhte AANAT Aktivität, einem Hauptenzym im Syntheseweg, und die folglich erhöhte Melatoninmenge, ist der Ca^{2+} Einstrom über L-Typ Kanäle und die cAMP level wichtig. Wenn diese Kanäle mit DHP inhibiert werden, kommt es zu einer Unterdrückung der AANAT Aktivität und der nachfolgenden Melatoninsynthese und-ausschüttung (Ivanova and Iuvone 2003).

Eine mögliche Hypothese zur Erklärung der Beobachtungen im $\text{Ca}_v1.3$ Mausmodell wären Veränderung in der Ca^{2+} Homöostase, hervorgerufen durch fehlende $\text{Ca}_v1.3$ Kanalaktivität, die sich nachfolgend auf die Melatoninsynthese auswirken. Einerseits wurde beschrieben, dass Melatonin in den rhythmischen Prozess der OS Abstoßung und Phagozytose durch das RPE involviert ist (Besharse and Dunis 1983; Ogino, Matsumura et al. 1983; White and Fisher 1989). Nach dieser Hypothese könnte Melatonin, sezerniert von den Photorezeptoren über Nacht, an Melatoninrezeptoren

im RPE binden, und so zur Regulation zirkadian regulierte Prozesse im RPE beitragen. Der genaue molekulare Mechanismus ist nur unvollständig verstanden (Wiechmann and Summers 2008). Eine fehlregulierte Melatoninsynthese könnte Störungen im Rhythmus der Phagozytose zur Folge haben. Allerdings gibt es auch gegenteilige Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, wonach Melatonin keinen Einfluss auf die Phagozytose besitzt (Grace, Chiba et al. 1999). Humane und Ratten RPE Zellen exprimieren Melatoninrezeptoren (Iuvone and Gan 1994; Nash and Osborne 1995). Interessanterweise wurde der in der Retina am häufigsten vorhandene Subtyp $Me1_{1b}$ im Bereich der apikalen Mikrovilli im RPE gefunden, nicht jedoch in der basalen Membran (Wiechmann, Udin et al. 2004). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass RPE Zellen eher durch das von Photorezeptoren gebildete Melatonin, als durch im Blutstrom zirkulierendes beeinflusst werden (Wiechmann and Summers 2008).

Die BK vermittelte Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ Signale durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf $Ca_v1.3$ spielt in der Regulation der rhythmischen Phagozytosefunktion der RPE Zellen eine wichtige Rolle. Über die zirkadiane Regulation von BK Kanälen in der Vertebraten Retina ist sehr wenig bekannt. In *Drosophila* wurde ein rhythmisches Expressionsmuster von Slowpoke (slo) und Slowpoke Binding Protein (Slob), einem Modulator der Kanalaktivität, in Fliegenköpfen gezeigt (Ceriani, Hogenesch et al. 2002) und dessen Rolle für die rhythmische Bewegungsaktivität der Tiere. In den Photorezeptoren der Fliegen wurde rhythmische Expression der Slob nachgewiesen (Jaramillo, Zheng et al. 2004). Diese Arbeiten belegen somit, dass die Expression des Ionenkanals und seiner Modulatoren einer rhythmischen Regulation unterliegt. Dabei kann diese periodische Regulation zeitabhängig ganz unterschiedliche Reaktionen hervorrufen.

Aus Untersuchungen am BK-/- Mausmodell weiß man, dass BK Kanäle einen starken Einfluss auf zirkadiane Rhythmen haben, indem der output des SCN geschwächt ist. Die BK-/- Tiere zeigen noch zirkadiane Rhythmen, aber das Ausmaß der Tag/Nacht Unterschiede ist sehr reduziert, und die Periode des biologischen Rhythmus leicht verlängert. Niedrigere Amplituden und Robustheit des zirkadianen Rhythmus in Laufradaktivität, Homecaging und Körpertemperatur wurden beobachtet (Meredith, Wiler et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass BK Transkription und Proteinmenge im SCN der Mäuse rhythmisch variieren (Panda, Antoch et al. 2002;

Meredith, Wiler et al. 2006), wobei die BK Proteinexpression und Ströme nachts am größten sind (Pitts, Ohta et al. 2006). Zirkadiane Rhythmen in der Retina sind völlig unabhängig vom SCN (Rankin, Yocum et al. 1993). Hier besteht aber ebenso die Möglichkeit, dass BK Rhythmik zum output der zirkadianen Oszillatoren beitragen (Vandael, Marcantoni et al. 2010).

Die Veränderungen in der Phagozytose-Rhythmik sind scheinbar nicht essentiell für die retinale Struktur und Funktion. Mäuse mit einer BK Defizienz weisen im Alter von 2 Monaten eine normale Anatomie der Retina und Photorezeptoraktivität in ERG Messungen auf (Tanimoto, Sothilingam et al. 2012). Zu einem anderen Ergebnis gelangt man jedoch durch die Untersuchung >1 Jahr alter Tiere. Hier scheint die morphologische Grobstruktur der Retina auf den ersten Blick intakt zu sein, in der genauen Analyse der Retinastruktur zeigte sich jedoch histologisch eine Verkürzung der Außensegmente der Photorezeptoren in BK^{-/-} Tieren. Weitere Hinweise auf Verkürzung der OS geben Messungen zum Rhodopsingehalt der Retinae, welcher in den knock-out Tieren ebenfalls verringert war, und ERG Messungen >1 Jahr alter Tiere (Daten nicht gezeigt), die eine verkleinerte a-Wellen Amplitude aufweisen. Vergleichbare Beobachtungen wurden in der Gas6 Knock-out Maus gemacht (Hall, Obin et al. 2005). Hier zeigen in vitro Daten klar die Rolle von Gas6 in der Phagozytose, Gas6 knock-out Mäuse haben jedoch eine normale Morphologie der Retina und weisen keine von den OS kommenden Ablagerungen an der Kontaktfläche RPE/Photorezeptoren auf. In den von mir untersuchten BK defizienten Mäusen weist die Phagozytose eine zirkadiane Rhythmik mit zeitlicher Verschiebungen auf. Die RPE Zellen sind in der Lage das Mehr an Phagozytose zu bewältigen, und den Verdauungsprozess der Phagosomen fortzuführen. Im BK^{-/-} Mäusen sind keine vermehrten Ablagerungen von autofluoreszentem Material im RPE zu finden. Anders dagegen im β 5-Integrin knock-out Mausmodell, welches Einschränkungen in der Phagozytoseleistung aufweist (Nandrot, Kim et al. 2004). Hier bewirkt der Verlust der zirkadianen Rhythmik, dass die zelluläre Maschinerie nicht für den Verdau der Phagosomen eingestellt ist, und es kommt zur Lipofuszin Akkumulation. Zusammenfassend ist im BK^{-/-} Mausmodell eine Zeitabhängigkeit der Dysbalance in der Phagozytose beobachtbar. Dabei kommt es zu einer verminderten Koordination zwischen Abschnürung und Phagozytose der OS.

Literaturverzeichnis

- Adato, A., V. Michel, et al. (2005). "Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins." Hum Mol Genet **14**(3): 347-56.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**(7): 1359-68.
- Allikmets, R., J. M. Seddon, et al. (1999). "Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies." Hum Genet **104**(6): 449-53.
- Alm, A. and A. Bill (1972). "The oxygen supply to the retina. I. Effects of changes in intraocular and arterial blood pressures, and in arterial P O₂ and P CO₂ on the oxygen tension in the vitreous body of the cat." Acta Physiol Scand **84**(2): 261-74.
- Alm, A. and A. Bill (1972). "The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues." Acta Physiol Scand **84**(3): 306-19.
- Anderson, D. H., S. K. Fisher, et al. (1978). "Mammalian cones: disc shedding, phagocytosis, and renewal." Invest Ophthalmol Vis Sci **17**(2): 117-33.
- Arden, G. B., A. Barrada, et al. (1962). "New clinical test of retinal function based upon the standing potential of the eye." Br J Ophthalmol **46**(8): 449-67.
- Baehr, W., S. M. Wu, et al. (2003). "The retinoid cycle and retina disease." Vision Res **43**(28): 2957-8.
- Bakall, B., R. A. Radu, et al. (2007). "Enhanced accumulation of A2E in individuals homozygous or heterozygous for mutations in BEST1 (VMD2)." Exp Eye Res **85**(1): 34-43.
- Barro-Soria, R., F. Aldehni, et al. (2009). "ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel." Pflugers Arch **459**(3): 485-97.
- Barro-Soria, R., R. Schreiber, et al. (2008). "Bestrophin 1 and 2 are components of the Ca(2+) activated Cl(-) conductance in mouse airways." Biochim Biophys Acta **1783**(10): 1993-2000.
- Barro Soria, R., M. Spitzner, et al. (2009). "Bestrophin-1 enables Ca²⁺-activated Cl-conductance in epithelia." J Biol Chem **284**(43): 29405-12.
- Bazan, N. G., W. C. Gordon, et al. (1992). "Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process." Adv Exp Med Biol **318**: 295-306.
- Berkefeld, H., B. Fakler, et al. (2010). "Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function." Physiol Rev **90**(4): 1437-59.
- Berkefeld, H., C. A. Sailer, et al. (2006). "BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling." Science **314**(5799): 615-20.
- Berridge, M. J. (1997). "The AM and FM of calcium signalling." Nature **386**(6627): 759-60.
- Berridge, M. J. (2005). "Unlocking the secrets of cell signaling." Annu Rev Physiol **67**: 1-21.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.

- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Besch, D., H. Jagle, et al. (2003). "Inherited multifocal RPE-diseases: mechanisms for local dysfunction in global retinoid cycle gene defects." Vision Res **43**(28): 3095-108.
- Besharse, J. C. and D. A. Dunis (1983). "Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding." Science **219**(4590): 1341-3.
- Besharse, J. C. and J. G. Hollyfield (1979). "Turnover of mouse photoreceptor outer segments in constant light and darkness." Invest Ophthalmol Vis Sci **18**(10): 1019-24.
- Bibb, C. and R. W. Young (1974). "Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments." J Cell Biol **61**(2): 327-43.
- Bobu, C. and D. Hicks (2009). "Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(7): 3495-502.
- Boeda, B., A. El-Amraoui, et al. (2002). "Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle." EMBO J **21**(24): 6689-99.
- Bok, D. (1993). "The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision." J Cell Sci Suppl **17**: 189-95.
- Bok, D. and M. O. Hall (1971). "The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat." J Cell Biol **49**(3): 664-82.
- Bolz, H. J. (2009). "[Genetics of Usher syndrome]." Ophthalmologe **106**(6): 496-504.
- Boon, C. J., B. J. Klevering, et al. (2009). "The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene." Prog Retin Eye Res **28**(3): 187-205.
- Bootman, M., E. Niggli, et al. (1997). "Imaging the hierarchical Ca²⁺ signalling system in HeLa cells." J Physiol **499** (Pt 2): 307-14.
- Boulton, M. and P. Dayhaw-Barker (2001). "The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes." Eye (Lond) **15**(Pt 3): 384-9.
- Braun, A., J. E. Gessner, et al. (2009). "STIM1 is essential for Fcγ receptor activation and autoimmune inflammation." Blood **113**(5): 1097-104.
- Brown, M., M. Marmor, et al. (2006). "ISCEV Standard for Clinical Electro-oculography (EOG) 2006." Doc Ophthalmol **113**(3): 205-12.
- Burnstock, G. (2004). "Introduction: P2 receptors." Curr Top Med Chem **4**(8): 793-803.
- Busquet, P., N. K. Nguyen, et al. (2010). "CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels modulate depression-like behaviour in mice independent of deaf phenotype." Int J Neuropsychopharmacol **13**(4): 499-513.
- Caberoy, N. B., Y. Zhou, et al. (2010). "Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis." EMBO J **29**(23): 3898-910.
- Cahalan, M. D. (2010). "Cell biology. How to STIMulate calcium channels." Science **330**(6000): 43-4.
- Cahalan, M. D., S. L. Zhang, et al. (2007). "Molecular basis of the CRAC channel." Cell Calcium **42**(2): 133-44.
- Cahill, G. M. and J. C. Besharse (1993). "Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors." Neuron **10**(4): 573-7.
- Carafoli, E. (2005). "Calcium--a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels." FEBS J **272**(5): 1073-89.
- Catterall, W. A. (1998). "Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release." Cell Calcium **24**(5-6): 307-23.

- Catterall, W. A., J. Striessnig, et al. (2003). "International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels." Pharmacol Rev **55**(4): 579-81.
- Ceriani, M. F., J. B. Hogenesch, et al. (2002). "Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior." J Neurosci **22**(21): 9305-19.
- Chaitin, M. H., M. O. Hall, et al. (1983). "Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(7): 812-20.
- Chang, Y. and S. C. Finnemann (2007). "Tetraspanin CD81 is required for the α v β 5-integrin-dependent particle-binding step of RPE phagocytosis." J Cell Sci **120**(Pt 17): 3053-63.
- Cheng, H., W. J. Lederer, et al. (1993). "Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle." Science **262**(5134): 740-4.
- Clapham, D. E. (1998). "The list of potential volume-sensitive chloride currents continues to swell (and shrink)." J Gen Physiol **111**(5): 623-4.
- Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell **131**(6): 1047-58.
- Clapham, D. E., L. W. Runnels, et al. (2001). "The TRP ion channel family." Nat Rev Neurosci **2**(6): 387-96.
- Clemett, R. (1991). "Vitelliform dystrophy: long-term observations on New Zealand pedigrees." Aust N Z J Ophthalmol **19**(3): 221-7.
- Colley, N. J. and M. O. Hall (1986). "Phagocytosis of light- and dark-adapted rod outer segments by cultured RPE cells: a reassessment." Exp Eye Res **42**(4): 323-9.
- Colton, C. K. and M. X. Zhu (2007). "2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels." Handb Exp Pharmacol (179): 173-87.
- Constable, P. A. (2011). "Nifedipine alters the light-rise of the electro-oculogram in man." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **249**(5): 677-84.
- Cordeiro, S., S. Seyler, et al. (2010). "Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(11): 6001-8.
- Cordeiro, S. and O. Strauss (2010). "Expression of Orai genes and I(CRAC) activation in the human retinal pigment epithelium." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **249**(1): 47-54.
- Cuttell, L., A. Vaughan, et al. (2008). "Undertaker, a *Drosophila* Junctophilin, links Draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis." Cell **135**(3): 524-34.
- D'Cruz, P. M., D. Yasumura, et al. (2000). "Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat." Hum Mol Genet **9**(4): 645-51.
- Deutman, A. F. (1969). "Electro-oculography in families with vitelliform dystrophy of the fovea. Detection of the carrier state." Arch Ophthalmol **81**(3): 305-16.
- Devuyt, O., P. T. Christie, et al. (1999). "Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease." Hum Mol Genet **8**(2): 247-57.
- Duncan, J. L., M. M. LaVail, et al. (2003). "An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(2): 826-38.
- Edwards, R. B. and P. M. Flaherty (1986). "Association of changes in intracellular cyclic AMP with changes in phagocytosis in cultured rat pigment epithelium." Curr Eye Res **5**(1): 19-26.

- Edwards, R. B. and R. B. Szamier (1977). "Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture." Science **197**(4307): 1001-3.
- Eliceiri, B. P., X. S. Puente, et al. (2002). "Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin $\alpha(v)\beta5$ in vascular endothelial growth factor signaling." J Cell Biol **157**(1): 149-60.
- Engel, J., C. Braig, et al. (2006). "Two classes of outer hair cells along the tonotopic axis of the cochlea." Neuroscience **143**(3): 837-49.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-16.
- Feletou, M. (2009). "Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?" Br J Pharmacol **156**(4): 545-62.
- Feng, W., D. Yasumura, et al. (2002). "Mertk triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells." J Biol Chem **277**(19): 17016-22.
- Feng, W., J. J. Zheng, et al. (2003). "Loss of RPE phenotype affects phagocytic function." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **241**(3): 232-40.
- Feske, S. (2010). "CRAC channelopathies." Pflugers Arch **460**(2): 417-35.
- Finnemann, S. C. (2003). "Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors." EMBO J **22**(16): 4143-54.
- Finnemann, S. C., V. L. Bonilha, et al. (1997). "Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires $\alpha(v)\beta5$ integrin for binding but not for internalization." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 12932-7.
- Finnemann, S. C. and E. Rodriguez-Boulan (1999). "Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins, and protein kinase C regulates $\alpha v \beta 5$ binding and cytoskeletal linkage." J Exp Med **190**(6): 861-74.
- Finnemann, S. C. and R. L. Silverstein (2001). "Differential roles of CD36 and $\alpha v \beta 5$ integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium." J Exp Med **194**(9): 1289-98.
- Fischmeister, R. and H. C. Hartzell (2005). "Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels." J Physiol **562**(Pt 2): 477-91.
- Fishman, M. L., M. A. Oberc, et al. (1977). "Ultrastructural demonstration of calcium in retina, retinal pigment epithelium and choroid." Exp Eye Res **24**(4): 341-53.
- Flannery, J. G. and S. K. Fisher (1984). "Circadian disc shedding in Xenopus retina in vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **25**(2): 229-32.
- Frangieh, G. T., W. R. Green, et al. (1982). "A histopathologic study of Best's macular dystrophy." Arch Ophthalmol **100**(7): 1115-21.
- Gao, H. and J. G. Hollyfield (1992). "Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**(1): 1-17.
- Gees, M., B. Colasoul, et al. (2010). "The role of transient receptor potential cation channels in Ca^{2+} signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(10): a003962.
- Ghatta, S., D. Nimmagadda, et al. (2006). "Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications." Pharmacol Ther **110**(1): 103-16.
- Gibbs, D., S. M. Azarian, et al. (2004). "Role of myosin VIIa and Rab27a in the motility and localization of RPE melanosomes." J Cell Sci **117**(Pt 26): 6473-83.

- Gibbs, D., J. Kitamoto, et al. (2003). "Abnormal phagocytosis by retinal pigmented epithelium that lacks myosin VIIa, the Usher syndrome 1B protein." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6481-6.
- Goldman, A. I. and P. J. O'Brien (1978). "Phagocytosis in the retinal pigment epithelium of the RCS rat." Science **201**(4360): 1023-5.
- Grace, M. S., A. Chiba, et al. (1999). "Circadian control of photoreceptor outer segment membrane turnover in mice genetically incapable of melatonin synthesis." Vis Neurosci **16**(5): 909-18.
- Grace, M. S., L. M. Wang, et al. (1996). "The tau mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster." Brain Res **735**(1): 93-100.
- Greenberg, S., J. el Khoury, et al. (1991). "Ca(2+)-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages." J Cell Biol **113**(4): 757-67.
- Gregory, C. Y., T. A. Abrams, et al. (1994). "Stimulation of A2 adenosine receptors inhibits the ingestion of photoreceptor outer segments by retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(3): 819-25.
- Grimes, W. N., W. Li, et al. (2009). "BK channels modulate pre- and postsynaptic signaling at reciprocal synapses in retina." Nat Neurosci **12**(5): 585-92.
- Gui, P., X. Wu, et al. (2006). "Integrin receptor activation triggers converging regulation of Cav1.2 calcium channels by c-Src and protein kinase A pathways." J Biol Chem **281**(20): 14015-25.
- Guido, M. E., E. Garbarino-Pico, et al. "Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system." Prog Neurobiol **92**(4): 484-504.
- Guido, M. E., E. Garbarino-Pico, et al. (2010). "Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system." Prog Neurobiol **92**(4): 484-504.
- Hall, M. O. and T. Abrams (1987). "Kinetic studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells." Exp Eye Res **45**(6): 907-22.
- Hall, M. O., T. A. Abrams, et al. (1991). "ROS ingestion by RPE cells is turned off by increased protein kinase C activity and by increased calcium." Exp Eye Res **52**(5): 591-8.
- Hall, M. O., T. A. Abrams, et al. (1993). "The phagocytosis of rod outer segments is inhibited by drugs linked to cyclic adenosine monophosphate production." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(8): 2392-401.
- Hall, M. O., B. L. Burgess, et al. (1996). "Further studies on the identification of the phagocytosis receptor of rat retinal pigment epithelial cells." Exp Eye Res **63**(3): 255-64.
- Hall, M. O., B. L. Burgess, et al. (1996). "Carbachol does not correct the defect in the phagocytosis of outer segments by Royal College of Surgeons rat retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(7): 1473-7.
- Hall, M. O., M. S. Obin, et al. (2005). "Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells." Exp Eye Res **81**(5): 581-91.
- Hall, M. O., M. S. Obin, et al. (2002). "Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro." Exp Eye Res **75**(4): 391-400.
- Hall, M. O., A. L. Prieto, et al. (2001). "Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6." Exp Eye Res **73**(4): 509-20.

- Hamann, S. (2002). "Molecular mechanisms of water transport in the eye." Int Rev Cytol **215**: 395-431.
- Hartzell, H. C., Z. Qu, et al. (2008). "Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies." Physiol Rev **88**(2): 639-72.
- Hasson, T., M. B. Heintzelman, et al. (1995). "Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9815-9.
- Herman, K. G. and R. H. Steinberg (1982). "Phagosome movement and the diurnal pattern of phagocytosis in the tapetal retinal pigment epithelium of the opossum." Invest Ophthalmol Vis Sci **23**(3): 277-90.
- Heth, C. A. and P. A. Marescalchi (1994). "Inositol triphosphate generation in cultured rat retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(2): 409-16.
- Heth, C. A. and S. Y. Schmidt (1991). "Phagocytic challenge induces changes in phosphorylation of retinal pigment epithelium proteins." Curr Eye Res **10**(11): 1049-57.
- Heth, C. A. and S. Y. Schmidt (1992). "Protein phosphorylation in retinal pigment epithelium of Long-Evans and Royal College of Surgeons rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**(10): 2839-47.
- Hu, H. Z., Q. Gu, et al. (2004). "2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3." J Biol Chem **279**(34): 35741-8.
- Hull, C., K. Studholme, et al. (2006). "Diurnal changes in exocytosis and the number of synaptic ribbons at active zones of an ON-type bipolar cell terminal." J Neurophysiol **96**(4): 2025-33.
- Inoue, A. and M. Ikebe (2003). "Characterization of the motor activity of mammalian myosin VIIA." J Biol Chem **278**(7): 5478-87.
- Ishida, K., N. Panjwani, et al. (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." Ocul Immunol Inflamm **11**(2): 91-105.
- Iuvone, P. M. and J. Gan (1994). "Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures." J Neurochem **63**(1): 118-24.
- Ivanova, T. N. and P. M. Iuvone (2003). "Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase, in photoreceptor cells." Brain Res **991**(1-2): 96-103.
- Jakus, Z., E. Simon, et al. (2009). "Critical role of phospholipase Cgamma2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis." J Exp Med **206**(3): 577-93.
- Jaramillo, A. M., X. Zheng, et al. (2004). "Pattern of distribution and cycling of SLOB, Slowpoke channel binding protein, in Drosophila." BMC Neurosci **5**: 3.
- Jentsch, T. J., V. Stein, et al. (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels." Physiol Rev **82**(2): 503-68.
- Karl, M. O., W. Kroeger, et al. (2008). "Endogenous Gas6 and Ca²⁺ -channel activation modulate phagocytosis by retinal pigment epithelium." Cell Signal **20**(6): 1159-68.
- Kennedy, C. J., P. E. Rakoczy, et al. (1996). "A simple flow cytometric technique to quantify rod outer segment phagocytosis in cultured retinal pigment epithelial cells." Curr Eye Res **15**(9): 998-1003.

- Kennedy, C. J., P. E. Rakoczy, et al. (1994). "Kinetic studies on phagocytosis and lysosomal digestion of rod outer segments by human retinal pigment epithelial cells in vitro." Exp Cell Res **210**(2): 209-14.
- Kevany, B. M. and K. Palczewski (2010). "Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors." Physiology (Bethesda) **25**(1): 8-15.
- Kindzelskii, A. L., V. M. Elner, et al. (2004). "Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments." J Gen Physiol **124**(2): 139-49.
- Knirsch, M., N. Brandt, et al. (2007). "Persistence of Ca(v)1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling." J Neurosci **27**(24): 6442-51.
- Ko, G. Y., L. Shi, et al. (2009). "Circadian regulation of ion channels and their functions." J Neurochem **110**(4): 1150-69.
- Ko, M. L., K. Jian, et al. (2009). "Phosphatidylinositol 3 kinase-Akt signaling serves as a circadian output in the retina." J Neurochem **108**(6): 1607-20.
- Ko, M. L., Y. Liu, et al. (2007). "The expression of L-type voltage-gated calcium channels in retinal photoreceptors is under circadian control." J Neurochem **103**(2): 784-92.
- Ko, M. L., L. Shi, et al. (2009). "Circadian controls outweigh acute illumination effects on the activity of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the retina." Neurosci Lett **451**(1): 74-8.
- Koschak, A., D. Reimer, et al. (2001). "alpha 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages." J Biol Chem **276**(25): 22100-6.
- Krahling, S., M. K. Callahan, et al. (1999). "Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages." Cell Death Differ **6**(2): 183-9.
- Kramer, F., H. Stohr, et al. (2004). "Cloning and characterization of the murine Vmd2 RFP-TM gene family." Cytogenet Genome Res **105**(1): 107-14.
- Kremer, H., E. van Wijk, et al. (2006). "Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways." Hum Mol Genet **15 Spec No 2**: R262-70.
- Laird, D. W. and R. S. Molday (1988). "Evidence against the role of rhodopsin in rod outer segment binding to RPE cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **29**(3): 419-28.
- LaVail, M. M. (1976). "Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting." Science **194**(4269): 1071-4.
- LaVail, M. M. (1980). "Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **19**(4): 407-11.
- Law, A. L., Q. Ling, et al. (2009). "Annexin A2 regulates phagocytosis of photoreceptor outer segments in the mouse retina." Mol Biol Cell **20**(17): 3896-904.
- Le Blanc, C., C. Mironneau, et al. (2004). "Regulation of vascular L-type Ca²⁺ channels by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." Circ Res **95**(3): 300-7.
- Lin, H. and D. O. Clegg (1998). "Integrin alphavbeta5 participates in the binding of photoreceptor rod outer segments during phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(9): 1703-12.
- Link, T. M., U. Park, et al. (2010). "TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis." Nat Immunol **11**(3): 232-9.
- Liou, J., M. L. Kim, et al. (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." Curr Biol **15**(13): 1235-41.

- Lipp, P. and M. D. Bootman (1997). "To quark or to spark, that is the question." J Physiol **502 (Pt 1)**: 1.
- Lipp, P. and E. Niggli (1998). "Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in Guinea-pig cardiac myocytes." J Physiol **508 (Pt 3)**: 801-9.
- Liu, X., B. Oudek, et al. (1998). "Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the RPE of shaker-1 mice." Nat Genet **19(2)**: 117-8.
- Liu, X., I. P. Udovichenko, et al. (1999). "Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium." J Neurosci **19(15)**: 6267-74.
- Long, K. O., S. K. Fisher, et al. (1986). "Disc shedding and autophagy in the cone-dominant ground squirrel retina." Exp Eye Res **43(2)**: 193-205.
- Lundqvist-Gustafsson, H., M. Gustafsson, et al. (2000). "Dynamic Ca^{2+} changes in neutrophil phagosomes A source for intracellular Ca^{2+} during phagolysosome formation?" Cell Calcium **27(6)**: 353-62.
- Mangini, N. J., L. Haugh-Scheidt, et al. (1997). "Sodium-calcium exchanger in cultured human retinal pigment epithelium." Exp Eye Res **65(6)**: 821-34.
- Mano, T. and D. G. Puro (1990). "Phagocytosis by human retinal glial cells in culture." Invest Ophthalmol Vis Sci **31(6)**: 1047-55.
- Mao, Y. and S. C. Finnemann (2012). "Essential diurnal Rac1 activation during retinal phagocytosis requires $\alpha 5 \beta 1$ integrin but not tyrosine kinases focal adhesion kinase or Mer tyrosine kinase." Mol Biol Cell **23(6)**: 1104-14.
- Marchant, D., K. Yu, et al. (2007). "New VMD2 gene mutations identified in patients affected by Best vitelliform macular dystrophy." J Med Genet **44(3)**: e70.
- Marmorstein, A. D., L. Y. Marmorstein, et al. (2000). "Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **97(23)**: 12758-63.
- Marmorstein, L. Y., J. Wu, et al. (2006). "The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1)." J Gen Physiol **127(5)**: 577-89.
- Marquardt, A., H. Stohr, et al. (1998). "Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease)." Hum Mol Genet **7(9)**: 1517-25.
- Mayerson, P. L. and M. O. Hall (1986). "Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro." J Cell Biol **103(1)**: 299-308.
- McKay, B. S., J. M. Burke, et al. (1994). "Separation of phenotypically distinct subpopulations of cultured human retinal pigment epithelial cells." Exp Cell Res **213(1)**: 85-92.
- McLaren, M. J. (1996). "Kinetics of rod outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. Relationship to cell morphology." Invest Ophthalmol Vis Sci **37(7)**: 1213-24.
- McLaren, M. J., G. Inana, et al. (1993). "Double fluorescent vital assay of phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **34(2)**: 317-26.
- Meredith, A. L., S. W. Wiler, et al. (2006). "BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output." Nat Neurosci **9(8)**: 1041-9.
- Mergler, S., K. Steinhausen, et al. (1998). "Altered regulation of L-type channels by protein kinase C and protein tyrosine kinases as a pathophysiologic effect in retinal degeneration." FASEB J **12(12)**: 1125-34.

- Mergler, S. and O. Strauss (2002). "Stimulation of L-type Ca^{2+} channels by increase of intracellular InsP_3 in rat retinal pigment epithelial cells." Exp Eye Res **74**(1): 29-40.
- Miceli, M. V., M. R. Liles, et al. (1994). "Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis." Exp Cell Res **214**(1): 242-9.
- Miceli, M. V. and D. A. Newsome (1996). "Effects of extracellular matrix and Bruch's membrane on retinal outer segment phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium." Curr Eye Res **15**(1): 17-26.
- Miceli, M. V., D. A. Newsome, et al. (1997). "Vitronectin is responsible for serum-stimulated uptake of rod outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(8): 1588-97.
- Michna, M., M. Knirsch, et al. (2003). "Cav1.3 ($\alpha 1D$) Ca^{2+} currents in neonatal outer hair cells of mice." J Physiol **553**(Pt 3): 747-58.
- Milenkovic, V. M., S. Krejcova, et al. "Interaction of bestrophin-1 and Ca^{2+} channel beta-subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus." PLoS One **6**(4): e19364.
- Milenkovic, V. M., S. Krejcova, et al. (2011). "Interaction of bestrophin-1 and Ca^{2+} channel beta-subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus." PLoS One **6**(4): e19364.
- Milenkovic, V. M., T. Langmann, et al. (2008). "Molecular evolution and functional divergence of the bestrophin protein family." BMC Evol Biol **8**: 72.
- Milenkovic, V. M., A. Rivera, et al. (2007). "Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane." J Biol Chem **282**(2): 1313-21.
- Milenkovic, V. M., E. Rohrl, et al. "Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance." J Cell Sci **124**(Pt 17): 2988-96.
- Milenkovic, V. M., E. Rohrl, et al. (2011). "Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance." J Cell Sci **124**(Pt 17): 2988-96.
- Miller, S. S. and J. L. Edelman (1990). "Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium." J Physiol **424**: 283-300.
- Mitchell, C. H. (2001). "Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space." J Physiol **534**(Pt 1): 193-202.
- Mitchell, C. H. and D. Reigada (2008). "Purinergic signalling in the subretinal space: a role in the communication between the retina and the RPE." Purinergic Signal **4**(2): 101-7.
- Molday, R. S. and D. MacKenzie (1983). "Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes." Biochemistry **22**(3): 653-60.
- Molday, R. S. and K. Zhang (2010). "Defective lipid transport and biosynthesis in recessive and dominant Stargardt macular degeneration." Prog Lipid Res **49**(4): 476-92.
- Mullins, R. F., K. T. Oh, et al. (2005). "Late development of vitelliform lesions and flecks in a patient with best disease: clinicopathologic correlation." Arch Ophthalmol **123**(11): 1588-94.
- Nandrot, E. F., M. Anand, et al. (2007). "Essential role for MFG-E8 as ligand for $\alpha\text{v}\beta 5$ integrin in diurnal retinal phagocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12005-10.

- Nandrot, E. F. and S. C. Finnemann (2008). "Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function." Ophthalmic Res **40**(3-4): 120-3.
- Nandrot, E. F., Y. Kim, et al. (2004). "Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin." J Exp Med **200**(12): 1539-45.
- Nash, M. S. and N. N. Osborne (1995). "Pertussis toxin-sensitive melatonin receptors negatively coupled to adenylate cyclase associated with cultured human and rat retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(1): 95-102.
- Neussert, R., C. Muller, et al. (2010). "The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER." Pflugers Arch **460**(1): 163-75.
- Newsome, D. A., E. P. Dobard, et al. (1990). "Human retinal pigment epithelium contains two distinct species of superoxide dismutase." Invest Ophthalmol Vis Sci **31**(12): 2508-13.
- Nilius, B. and G. Owsianik (2011). "The transient receptor potential family of ion channels." Genome Biol **12**(3): 218.
- Nilius, B., G. Owsianik, et al. (2007). "Transient receptor potential cation channels in disease." Physiol Rev **87**(1): 165-217.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev **82**(4): 1013-67.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox, et al. (1985). "Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(7): 2178-82.
- Nunes, P., N. Demareux, et al. (2010). "The role of calcium signaling in phagocytosis." J Leukoc Biol **88**(1): 57-68.
- O'Day, W. T. and R. W. Young (1978). "Rhythmic daily shedding of outer-segment membranes by visual cells in the goldfish." J Cell Biol **76**(3): 593-604.
- Ogino, N., M. Matsumura, et al. (1983). "Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelial cells from chick embryo: inhibition by melatonin and cyclic AMP, and its reversal by taurine and cyclic GMP." Ophthalmic Res **15**(2): 72-89.
- Panda, S., M. P. Antoch, et al. (2002). "Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock." Cell **109**(3): 307-20.
- Parekh, A. B. (2010). "Store-operated CRAC channels: function in health and disease." Nat Rev Drug Discov **9**(5): 399-410.
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.
- Park, H., S. J. Oh, et al. (2009). "Bestrophin-1 encodes for the Ca²⁺-activated anion channel in hippocampal astrocytes." J Neurosci **29**(41): 13063-73.
- Parver, L. M., C. Auker, et al. (1980). "Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula." Am J Ophthalmol **89**(5): 641-6.
- Pelucchi, B., A. Grimaldi, et al. (2008). "Vertebrate rod photoreceptors express both BK and IK calcium-activated potassium channels, but only BK channels are involved in receptor potential regulation." J Neurosci Res **86**(1): 194-201.
- Pennartz, C. M., M. T. de Jeu, et al. (2002). "Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock." Nature **416**(6878): 286-90.
- Peterson, W. M., C. Meggyesy, et al. (1997). "Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium." J Neurosci **17**(7): 2324-37.

- Petrukhin, K., M. J. Koisti, et al. (1998). "Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy." Nat Genet **19**(3): 241-7.
- Pitts, G. R., H. Ohta, et al. (2006). "Daily rhythmicity of large-conductance Ca²⁺ - activated K⁺ currents in suprachiasmatic nucleus neurons." Brain Res **1071**(1): 54-62.
- Platzer, J., J. Engel, et al. (2000). "Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels." Cell **102**(1): 89-97.
- Pollack, K., F. R. Kreuz, et al. (2005). "[Best's disease with normal EOG. Case report of familial macular dystrophy]." Ophthalmology **102**(9): 891-4.
- Prakriya, M., S. Feske, et al. (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." Nature **443**(7108): 230-3.
- Qin, S. and G. A. Rodrigues (2012). "Roles of alpha5beta1, FAK and MerTK in oxidative stress inhibition of RPE cell phagocytosis." Exp Eye Res **94**(1): 63-70.
- Rankin, B. M., S. A. Yocum, et al. (1993). "Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc gamma receptor cross-linking. Regulation by the phosphotyrosine phosphatase CD45." J Immunol **150**(2): 605-16.
- Reichhart, N., V. M. Milenkovic, et al. (2010). "Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit." Exp Eye Res **91**(5): 630-9.
- Reigada, D., W. Lu, et al. (2005). "Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium." Am J Physiol Cell Physiol **289**(3): C617-24.
- Reigada, D. and C. H. Mitchell (2005). "Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport." Am J Physiol Cell Physiol **288**(1): C132-40.
- Reigada, D., X. Zhang, et al. (2006). "Stimulation of an alpha1-adrenergic receptor downregulates ecto-5' nucleotidase activity on the apical membrane of RPE cells." Purinergic Signal **2**(3): 499-507.
- Reiners, J., T. Marker, et al. (2005). "Photoreceptor expression of the Usher syndrome type 1 protein protocadherin 15 (USH1F) and its interaction with the scaffold protein harmonin (USH1C)." Mol Vis **11**: 347-55.
- Reiners, J., B. Reidel, et al. (2003). "Differential distribution of harmonin isoforms and their possible role in Usher-1 protein complexes in mammalian photoreceptor cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(11): 5006-15.
- Reiners, J., E. van Wijk, et al. (2005). "Scaffold protein harmonin (USH1C) provides molecular links between Usher syndrome type 1 and type 2." Hum Mol Genet **14**(24): 3933-43.
- Renner, A. B., H. Tillack, et al. (2005). "Late onset is common in best macular dystrophy associated with VMD2 gene mutations." Ophthalmology **112**(4): 586-92.
- Rizzolo, L. J. (1997). "Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier." Histol Histopathol **12**(4): 1057-67.
- Rizzolo, L. J. (2007). "Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium." Int Rev Cytol **258**: 195-234.
- Robb-Gaspers, L. D. and A. P. Thomas (1995). "Coordination of Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ waves in the intact liver." J Biol Chem **270**(14): 8102-7.
- Rodriguez de Turco, E. B., N. Parkins, et al. (1999). "Selective retinal pigment epithelial cell lipid metabolism and remodeling conserves photoreceptor docosahexaenoic acid following phagocytosis." J Neurosci Res **57**(4): 479-86.

- Rosenthal, R., B. Bakall, et al. (2006). "Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca^{2+} channels in retinal pigment epithelial cells." FASEB J **20**(1): 178-80.
- Rosenthal, R., H. Heimann, et al. (2007). " Ca^{2+} channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease." Mol Vis **13**: 443-56.
- Rosenthal, R., G. Malek, et al. (2005). "The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **337**(1): 241-7.
- Rosenthal, R. and O. Strauss (2002). " Ca^{2+} -channels in the RPE." Adv Exp Med Biol **514**: 225-35.
- Ruggiero, L., M. P. Connor, et al. (2012). "Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not *Itgb5*^{-/-} or *Mfge8*^{-/-} mouse retina." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(21): 8145-8.
- Ryeom, S. W., R. L. Silverstein, et al. (1996). "Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36." J Biol Chem **271**(34): 20536-9.
- Ryeom, S. W., J. R. Sparrow, et al. (1996). "CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium." J Cell Sci **109 (Pt 2)**: 387-95.
- Saito, M., P. I. Hanson, et al. (2007). "Luminal chloride-dependent activation of endosome calcium channels: patch clamp study of enlarged endosomes." J Biol Chem **282**(37): 27327-33.
- Sakaba, T., H. Ishikane, et al. (1997). " Ca^{2+} -activated K^{+} current at presynaptic terminals of goldfish retinal bipolar cells." Neurosci Res **27**(3): 219-28.
- Salceda, R. and J. R. Riesgo-Escovar (1990). "Characterization of calcium uptake in chick retinal pigment epithelium." Pigment Cell Res **3**(3): 141-5.
- Sausbier, M., H. Hu, et al. (2004). "Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^{+} channel deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9474-8.
- Sausbier, U., M. Sausbier, et al. (2006). " Ca^{2+} -activated K^{+} channels of the BK-type in the mouse brain." Histochem Cell Biol **125**(6): 725-41.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Nature **343**(6254): 170-3.
- Sheu, S. J., Y. S. Bee, et al. (2008). "Resveratrol and large-conductance calcium-activated potassium channels in the protection of human retinal pigment epithelial cells." J Ocul Pharmacol Ther **24**(6): 551-5.
- Sheu, S. J. and S. N. Wu (2003). "Mechanism of inhibitory actions of oxidizing agents on calcium-activated potassium current in cultured pigment epithelial cells of the human retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(3): 1237-44.
- Sheu, S. J., S. N. Wu, et al. (2005). "Stretch-stimulated activity of large conductance calcium-activated potassium channels in human retinal pigment epithelial cells." J Ocul Pharmacol Ther **21**(6): 429-35.
- Sheu, S. J., S. N. Wu, et al. (2004). "The influence of hypotonicity on large-conductance calcium-activated potassium channels in human retinal pigment epithelial cells." J Ocul Pharmacol Ther **20**(6): 563-75.
- Smith, R. J., C. I. Berlin, et al. (1994). "Clinical diagnosis of the Usher syndromes. Usher Syndrome Consortium." Am J Med Genet **50**(1): 32-8.
- Sparrow, J. R., S. W. Ryeom, et al. (1997). "CD36 expression is altered in retinal pigment epithelial cells of the RCS rat." Exp Eye Res **64**(1): 45-56.

- Stanton, J. B., A. F. Goldberg, et al. (2006). "Hydrodynamic properties of porcine bestrophin-1 in Triton X-100." Biochim Biophys Acta **1758**(2): 241-7.
- Steinberg, R. H. (1985). "Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina." Doc Ophthalmol **60**(4): 327-46.
- Steinckwich, N., V. Schenten, et al. (2011). "An essential role of STIM1, Orai1, and S100A8-A9 proteins for Ca²⁺ signaling and FcγR-mediated phagosomal oxidative activity." J Immunol **186**(4): 2182-91.
- Stohr, H., A. Marquardt, et al. (2002). "Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family." Eur J Hum Genet **10**(4): 281-4.
- Stohr, H., A. Marquardt, et al. (1998). "A gene map of the Best's vitelliform macular dystrophy region in chromosome 11q12-q13.1." Genome Res **8**(1): 48-56.
- Stohr, H., V. Milenkovic, et al. (2005). "[VMD2 and its role in Best's disease and other retinopathies]." Ophthalmologe **102**(2): 116-21.
- Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." Physiol Rev **85**(3): 845-81.
- Strauss, O., F. Buss, et al. (2000). "Activation of neuroendocrine L-type channels (α1D subunits) in retinal pigment epithelial cells and brain neurons by pp60(c-src)." Biochem Biophys Res Commun **270**(3): 806-10.
- Strauss, O., S. Mergler, et al. (1997). "Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells." FASEB J **11**(11): 859-67.
- Strauss, O., F. Stumpff, et al. (1998). "The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect." Acta Anat (Basel) **162**(2-3): 101-11.
- Strauss, O. and M. Wienrich (1994). "Ca(2+)-conductances in cultured rat retinal pigment epithelial cells." J Cell Physiol **160**(1): 89-96.
- Streilein, J. W., N. Ma, et al. (2002). "Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants." Vision Res **42**(4): 487-95.
- Striessnig, J. (1999). "Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels." Cell Physiol Biochem **9**(4-5): 242-69.
- Striessnig, J., J. C. Hoda, et al. (2004). "L-type Ca²⁺ channels in Ca²⁺ channelopathies." Biochem Biophys Res Commun **322**(4): 1341-6.
- Sun, H., T. Tsunenari, et al. (2002). "The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 4008-13.
- Sung, C. H. and J. Z. Chuang (2010). "The cell biology of vision." J Cell Biol **190**(6): 953-63.
- Tanimoto, N., V. Sothilingam, et al. (2012). "BK channels mediate pathway-specific modulation of visual signals in the in vivo mouse retina." J Neurosci **32**(14): 4861-6.
- Terman, J. S., C. E. Reme, et al. (1993). "Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus." Brain Res **605**(2): 256-64.
- Tokuda, N., T. Mano, et al. (1992). "Phagocytosis by the murine testicular TM4 Sertoli cell line in culture." J Urol **147**(1): 278-82.
- Tosini, G. and M. Menaker (1996). "Circadian rhythms in cultured mammalian retina." Science **272**(5260): 419-21.
- Tosini, G., N. Pozdeyev, et al. (2008). "The circadian clock system in the mammalian retina." Bioessays **30**(7): 624-33.
- Tsunenari, T., H. Sun, et al. (2003). "Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels." J Biol Chem **278**(42): 41114-25.

- Udovichenko, I. P., D. Gibbs, et al. (2002). "Actin-based motor properties of native myosin VIIa." J Cell Sci **115**(Pt 2): 445-50.
- Ueda, Y. and R. H. Steinberg (1993). "Voltage-operated calcium channels in fresh and cultured rat retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(12): 3408-18.
- Ueda, Y. and R. H. Steinberg (1995). "Dihydropyridine-sensitive calcium currents in freshly isolated human and monkey retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(2): 373-80.
- Ulshafer, R. J., C. B. Allen, et al. (1990). "Distributions of elements in the human retinal pigment epithelium." Arch Ophthalmol **108**(1): 113-7.
- Vandaele, D. H., A. Marcantoni, et al. (2010). "Ca(v)1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing." Mol Neurobiol **42**(3): 185-98.
- Vig, M., A. Beck, et al. (2006). "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." Curr Biol **16**(20): 2073-9.
- Vig, M., C. Peinelt, et al. (2006). "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry." Science **312**(5777): 1220-3.
- Vollrath, D., W. Feng, et al. (2001). "Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12584-9.
- Wabbits, B., M. N. Preising, et al. (2006). "Genotype-phenotype correlation and longitudinal course in ten families with Best vitelliform macular dystrophy." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **244**(11): 1453-66.
- Wainszelbaum, M. J., B. M. Proctor, et al. (2006). "IL4/PGE2 induction of an enlarged early endosomal compartment in mouse macrophages is Rab5-dependent." Exp Cell Res **312**(12): 2238-51.
- Wei, A. D., G. A. Gutman, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 463-72.
- Weingeist, T. A., J. L. Kobrin, et al. (1982). "Histopathology of Best's macular dystrophy." Arch Ophthalmol **100**(7): 1108-14.
- White, K., A. Marquardt, et al. (2000). "VMD2 mutations in vitelliform macular dystrophy (Best disease) and other maculopathies." Hum Mutat **15**(4): 301-8.
- White, M. P. and L. J. Fisher (1989). "Effects of exogenous melatonin on circadian disc shedding in the albino rat retina." Vision Res **29**(2): 167-79.
- Wiechmann, A. F. and J. A. Summers (2008). "Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues." Prog Retin Eye Res **27**(2): 137-60.
- Wiechmann, A. F., S. B. Udin, et al. (2004). "Localization of Mel1b melatonin receptor-like immunoreactivity in ocular tissues of *Xenopus laevis*." Exp Eye Res **79**(4): 585-94.
- Williams, D. S. (2008). "Usher syndrome: animal models, retinal function of Usher proteins, and prospects for gene therapy." Vision Res **48**(3): 433-41.
- Wimmers, S., L. Coeppeus, et al. (2008). "Expression profile of voltage-dependent Ca²⁺ channel subunits in the human retinal pigment epithelium." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **246**(5): 685-92.
- Wimmers, S., C. Halsband, et al. (2008). "Voltage-dependent Ca²⁺ channels, not ryanodine receptors, activate Ca²⁺-dependent BK potassium channels in human retinal pigment epithelial cells." Mol Vis **14**: 2340-8.
- Wimmers, S., M. O. Karl, et al. (2007). "Ion channels in the RPE." Prog Retin Eye Res **26**(3): 263-301.

- Wimmers, S. and O. Strauss (2007). "Basal calcium entry in retinal pigment epithelial cells is mediated by TRPC channels." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(12): 5767-72.
- Wollmann, G., S. Lenzner, et al. (2006). "Voltage-dependent ion channels in the mouse RPE: comparison with Norrie disease mice." Vision Res **46**(5): 688-98.
- Wu, J., A. D. Marmorstein, et al. (2007). "Voltage-dependent calcium channel CaV1.3 subunits regulate the light peak of the electroretinogram." J Neurophysiol **97**(5): 3731-5.
- Wu, X., J. E. Mogford, et al. (1998). "Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by alpha v beta3 and alpha5 beta1 integrin ligands." J Cell Biol **143**(1): 241-52.
- Wu, Y., N. Tibrewal, et al. (2006). "Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill." Trends Cell Biol **16**(4): 189-97.
- Xiao, Q., H. C. Hartzell, et al. (2010). "Bestrophins and retinopathies." Pflugers Arch **460**(2): 559-69.
- Yardley, J., B. P. Leroy, et al. (2004). "Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC)." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(10): 3683-9.
- Young, R. W. (1967). "The renewal of photoreceptor cell outer segments." J Cell Biol **33**(1): 61-72.
- Young, R. W. (1976). "Visual cells and the concept of renewal." Invest Ophthalmol Vis Sci **15**(9): 700-25.
- Young, R. W. (1978). "The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **17**(2): 105-16.
- Young, R. W. and D. Bok (1969). "Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process." J Cell Biol **42**(2): 392-403.
- Young, R. W. and B. Droz (1968). "The renewal of protein in retinal rods and cones." J Cell Biol **39**(1): 169-84.
- Yu, K., Z. Qu, et al. (2007). "Chloride channel activity of bestrophin mutants associated with mild or late-onset macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(10): 4694-705.
- Yu, K., Q. Xiao, et al. (2008). "The best disease-linked Cl⁻ channel hBest1 regulates Ca_v1.1 (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains." J Neurosci **28**(22): 5660-70.
- Zeng, H., E. Gordon, et al. (2008). "1-[1-Hexyl-6-(methoxy)-1H-indazol-3-yl]-2-methyl-1-propanone, a potent and highly selective small molecule blocker of the large-conductance voltage-gated and calcium-dependent K⁺ channel." J Pharmacol Exp Ther **327**(1): 168-77.
- Zhang, S. L., A. V. Yeromin, et al. (2006). "Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9357-62.
- Zhang, Y., J. B. Stanton, et al. (2010). "Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease." Hum Mol Genet **19**(6): 1108-18.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Olaf Strauß danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung der Arbeit, sowie für seine große Geduld und Unterstützung in allen Situationen während meiner Zeit als Doktorandin.

Ich danke Herrn Prof. Stephan Schneuwly für die Übernahme des Gutachtens, und PD. Dr. Rudolph Fuchshofer, Prof. Dr. Richard Warth, Prof. Dr. Hayo Castrop für die Bereitschaft am Prüfungsausschuss teilzunehmen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Ralph Witzgall und Uwe Devries für die Bereitstellung des konfokalen Mikroskops.

Mein Dank gilt allen Kollegen in der Arbeitsgruppe Nestor, Rene, Renate, Elfriede, Andrea, Isabel, Raquel, Simon, Julia, Nadine für die Unterstützung während unserer Zusammenarbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für die Unterstützung und Hilfe während der Zeit meiner Doktorarbeit.