

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR AUGENHEILKUNDE

PROF. DR. HORST HELBIG

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BETEILIGUNG SPANNUNGSABHÄNGIGER L-TYP-CALCIUM-KANÄLE AM
SPEICHERABHÄNGIGEN CALCIUM-EINSTROM IN ARPE-19-ZELLEN:
EINFLUSS VON BESTROPHIN-1 WILDTYP UND MUTANTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Isabel Bachmeier

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Horst Helbig
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Wetzel
Tag der mündlichen Prüfung:	19.03.2019

1	Einleitung	6
1.1	Die Bedeutung des Sehens	6
1.2	Aufbau des Auges, der Sehbahn und der Netzhaut	7
1.3	Funktionen des retinalen Pigmentepithels (RPE)	9
1.4	Elektrookulogramm (EOG)	11
1.5	Morbus Best	12
1.6	Bestrophin-1 und <i>BEST1</i>	13
1.7	Calcium- <i>Signaling</i> und der speicherabhängige Calcium-Einstrom (SOCE) im RPE	14
1.8	L-Typ-Calcium-Kanäle und ihre Beteiligung am SOCE – Beeinflussung durch Bestrophin-1?	17
1.8.1	Die Pharmakologie des Dihydropyridin-Derivats (R)-(+)-Bay K 8644	19
1.8.2	Die humane RPE-Zelllinie ARPE-19	20
1.8.3	Protein-Lokalisation und Protein- <i>Trafficking</i> von Bestrophin-1 Wildtyp und Mutanten	21
2	Material	22
3	Methoden	30
3.1	Klonierung der bicistronischen Vektoren <i>pBudCE4.1-YFP</i> und <i>pBudCE4.1-YFP-hbest1(-Wildtyp und Mutanten)</i>	30
3.1.1	Prinzipielles Vorgehen	30
3.1.2	PCR zur Erweiterung von <i>pcDNA3.1-YFP</i> um die Schnittstellen von XbaI und Scal	32
3.1.3	Plasmidverdau und Restriktionsenzyme	33
3.1.4	Gelextraktion	35
3.1.5	Ligation	35
3.1.6	Transformation	35
3.1.7	Plasmid-Kontrolle durch PCR nach Vermehrung in <i>Escherichia coli</i> („Kolonie-PCR“)	36
3.1.8	„Mini-preps“	37

3.1.9	Sequenzierung	38
3.1.10	„Midi-preps“	39
3.1.11	Glycerin-Kulturen	39
3.1.12	Kontrollverdau	40
3.2	Zellkultur von ARPE-19-Zellen	42
3.3	Transfektion von ARPE-19-Zellen	42
3.4	Western Blot	43
3.5	Immunfluoreszenzmikroskopie	44
3.6	Calcium Imaging	46
3.6.1	Grundlagen des Calcium Imaging-Experiments	46
3.6.2	Statistische Auswertung der Calcium Imaging-Experimente	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Nachweis von Bestrophin-1 (Wildtyp und Mutanten) und YFP in ARPE-19-Zellen mittels Western Blot	54
4.2	Nachweis der Lokalisation von Bestrophin-1 (Wildtyp und Mutanten) in ARPE-19-Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	55
4.3	SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen mit und ohne Bestrophin-1 Wildtyp und Mutanten im Calcium Imaging-Experiment	57
4.3.1	SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in untransfizierten ARPE-19-Zellen	57
4.3.2	Einfluss von Wildtyp Bestrophin-1 auf den SOCE und auf die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen	59
4.3.3	Einfluss von mutantern Bestrophin-1 auf den SOCE und auf die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen	63
5	Diskussion	67
5.1	Aussagekraft der Methoden	67
5.1.1	Calcium Imaging-Experimente	67
5.1.2	Protein-Trafficking-Experimente	69
5.2	Protein-Trafficking von Bestrophin-1 (Wildtyp und Mutanten) in ARPE-19-Zellen	71

5.3	SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen	72
5.4	Einfluss von Bestrophin-1 Wildtyp auf den SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen	73
5.5	Einfluss von Bestrophin-1-Mutanten auf den SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen	74
5.6	Einordnung der Ergebnisse in die Hypothese zum Pathomechanismus bei Morbus Best	75
6	Zusammenfassung	76
7	Anhang	77
7.1	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer, Gele, Medien und Kulturplatten	77
7.2	Western Blot Originalblots	80
8	Literaturverzeichnis	81
9	Abkürzungsverzeichnis	99
10	Danksagung	
11	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung des Sehens

„Die Augen sind das Fenster zur Seele und das Tor zur Welt“ (1). Die Bedeutung des Sehens spiegelt sich nicht nur in geläufigen Redewendungen wider, sondern wird auch in zahlreichen Umfragen zu Ängsten in der Bevölkerung deutlich. Diesen zur Folge fürchten Menschen allem voran Blindheit und den damit einhergehenden Verlust von Unabhängigkeit und Lebensqualität - noch vor Taubheit, Herzinfarkt, Alzheimer-Demenz, AIDS und Terroranschlägen (2–7).

Der Begriff der Blindheit ist hierbei nach Laienverständnis sicherlich anders gefasst als nach den festen Kriterien z.B. von gesetzlichen Bestimmungen und Versorgungsrichtlinien, welche sich wiederum von Nation zu Nation unterscheiden. In Deutschland gilt als blind, wer eine bestkorrigierte Sehschärfe von 1/50 („2%“) oder weniger am besseren Auge oder eine vergleichbar schwere Beeinträchtigung wie etwa eine Gesichtsfeldeinschränkung auf die zentralen 5° aufweist (8). Hingegen sind die Grenzen in anderen Ländern deutlich lockerer gesteckt und liegen zum Beispiel im Vereinigten Königreich bei weniger als 1/20 („5%“) (oder einer klinisch signifikanten Gesichtsfeldeinschränkung mit funktioneller Beeinträchtigung) (9), in den USA bei 1/10 („10%“) (oder einer Einschränkung des Gesichtsfelds auf die zentralen 20°) (10) und gemäß der *World Health Organisation (WHO)* bei weniger als 1/20 („5%“) (bzw. einer Gesichtsfeldeinschränkung auf 10°) (11).

Und noch vielfältiger als die Bestimmungen, ab wann ein Mensch als blind gilt, sind die Faktoren und Erkrankungen, die zu einer Sehminderung bis hin zur Erblindung führen können. Ein visueller Reiz wird über mehrere Stufen der Sehbahn vom Auge zum Gehirn geleitet und verarbeitet, bis er bewusst als Seheindruck wahrgenommen wird. Auf jeder Stufe der Sehbahn kann es zur Störung kommen.

1.2 Aufbau des Auges, der Sehbahn und der Netzhaut

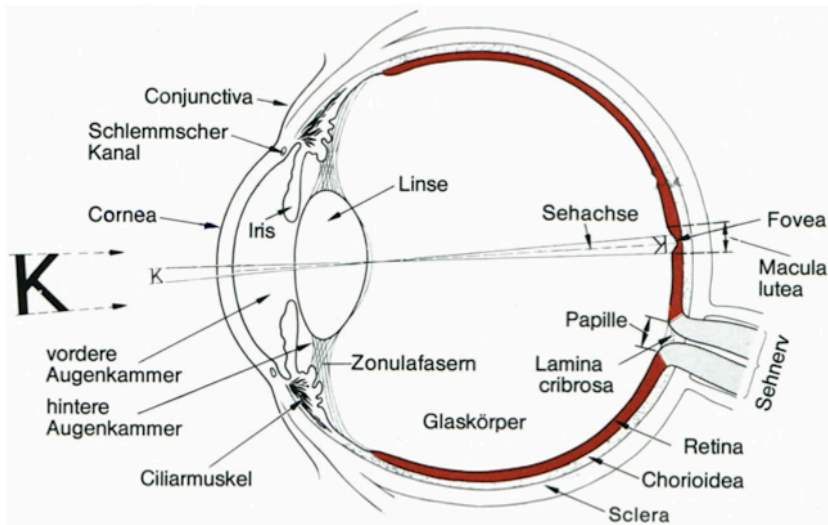


Abb. 1 Aufbau des menschlichen Auges

Das menschliche Auge lässt sich einteilen in vorderen Augenabschnitt (u.a. Hornhaut (*Cornea*), Regenbogenhaut (*Iris*) und Linse) und hinteren Augenabschnitt (u.a. Netzhaut (*Retina*, in rot dargestellt), wobei die Makula (*Macula lutea*) die Stelle des schärfsten Sehens bezeichnet).

(Quelle: Schmidt RF et Thews G (12))

Abb. 1 zeigt schematisch den Aufbau des menschlichen Auges. Das einfallende Licht wird von Hornhaut und Linse gebündelt und auf der Netzhaut (*Retina*) abgebildet. Dort wird es als visueller Reiz von den Photorezeptoren der Netzhaut detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Makula (*Macula lutea*, gelber Fleck) bezeichnet hierbei die Stelle des schärfsten Sehens. Die Bildinformation wird über die sogenannten Bipolarzellen weiter verschaltet und dann in Form einer Parallelverarbeitung der unterschiedlichen Bildqualitäten wie Farbe, Bewegung, Helligkeit etc. durch die rezeptiven Felder spezialisierter retinaler Ganglienzellen ausgelesen und weitergeleitet (12). Die Fortsätze der Ganglienzellen verlassen zum Sehnerven (*Nervus opticus*) gebündelt das Auge in Richtung Gehirn. Nach einer in der Sehnervenkreuzung (*Chiasma opticum*) stattfindenden Sortierung in linke und rechte Gesichtsfeldhälfte gelangt die Information über den Sehstrang (*Tractus opticus*) und nach einer synaptischen Umschaltung im seitlichen Kniehöcker (*Corpus geniculatum laterale*) über die Sehstrahlung (*Radiatio optica*) schließlich zur Sehrinde (visueller Kortex) im Okzipitallappen (siehe Abb. 2) (12).

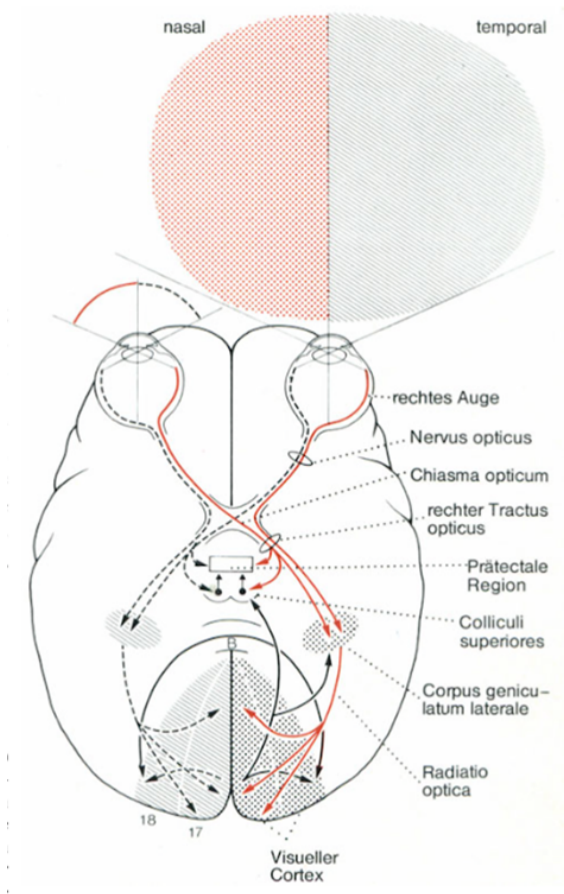


Abb. 2 Stufen der zentralen Sehbahn

Ein visueller Reiz wird nach der Verarbeitung im Auge über folgende Stufen der zentralen Sehbahn zum Gehirn fortgeleitet: Nervus opticus, Chiasma opticum, Tractus opticus, Corpus geniculatum laterale, Radiatio optica, visueller Kortex.

(Quelle: Schmidt RF et Thews G (12))

Die Netzhaut steht also ganz am Anfang eines komplexen visuellen Verarbeitungssystems. Ihr Aufbau soll nun näher erläutert werden.

Eingeteilt wird die Netzhaut in das *Stratum nervosum retinae* (Neuroretina), zusammengesetzt aus einer Vielzahl von Zelltypen und Zellschichten, und das einschichtige *Stratum pigmentosum retinae* (retinales Pigmentepithel). Die Neuroretina besteht aus Photorezeptoren, Bipolarzellen, Ganglienzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Müllerscher Radialglia (siehe Abb. 3) (12). Die Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen) stellen die äußerste Zellschicht der Neuroretina dar und werden weiter in ein Innen- und ein Außensegment unterteilt. Während die Innensegmente den stoffwechselaktiven Anteil darstellen, enthalten die Membranscheibchen der Stäbchen-Außensegmente bzw. die Membraneinschnürungen der Zapfen-Außensegmente die zur Aufnahme des Lichtreizes wichtigen Photopigmente (12).

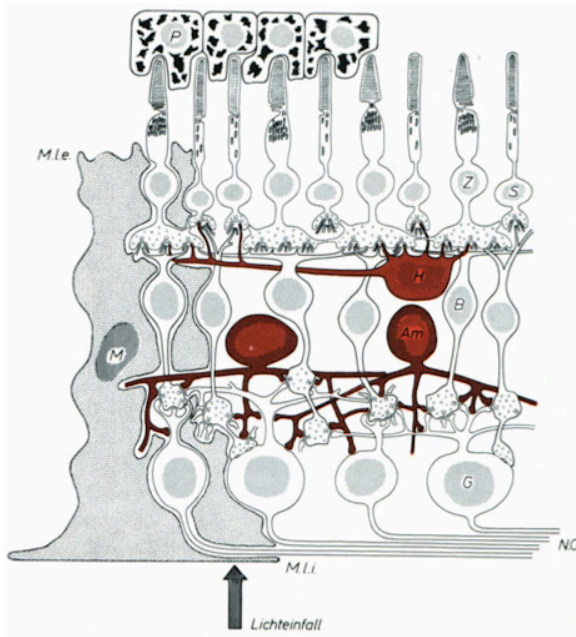


Abb. 3 Aufbau der Netzhaut

Gezeigt wird der Aufbau der Netzhaut (*Retina*). Die *Retina* lässt sich in retinales Pigmentepithel (*Stratum pigmentosum retinae*, in der Abbildung oberste Zellschicht) und Neuroretina (*Stratum nervosum retinae*, in der Abbildung übrige Zellgruppen) einteilen.

Am: Amakrinzelle, B: Bipolarzelle, G: Ganglienzelle, H: Horizontalzelle, M: Müller-Zelle, M.l.e.: Membrana limitans externa, M.l.i.: Membrana limitans interna, N.O.: Nervus opticus, P: Pigmentepithelzelle, S: Stäbchen, Z: Zapfen

(Quelle: Schmidt RF et Thews (12))

1.3 Funktionen des retinalen Pigmentepithels (RPE)

Photorezeptoren und retinale Pigmentepithelzellen sind als enge funktionelle Einheit zu sehen (13). Eine gestörte Funktion der RPE-Zellen führt zur Degeneration von Photorezeptoren und umgekehrt.

Die Photorezeptoraußensegmente unterliegen einem kontinuierlichen Erneuerungsprozess. Neues Material wird von den Innensegmenten produziert, wandert in den Außensegmenten in Richtung RPE und wird nach und nach abgestoßen. Die älteren äußeren Membranscheibchen bzw. -einschnürungen werden von den apikalen mikrovillären Fortsätzen der RPE-Zellen umschlossen und phagozytiert sowie recycelt (14). Das gebleichte Photopigment wird regeneriert (Retinalzyklus) (15). Dies ist nur ein Teil der zahlreichen Aufgaben des RPE (siehe Abb. 4).

Im Rahmen der Lichtwahrnehmung ist das RPE neben der Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente und der Regeneration von gebleichtem Photopigment auch für die Lichtabsorption zuständig. Dies geschieht über seine Pigmentgranula in den Melanosomen sowie weitere Pigmente wie Lutein und Zeaxanthin (16). Zum einen wird Streulicht absorbiert, was zu einer verbesserten optischen Abbildungsqualität führt. Zum anderen kommt der Lichtabsorption eine hohe Bedeutung zu, da sie Schutz vor oxidativem Stress bietet. Durch die Kombination aus hoher Lichtenergiedichte und hohem Sauerstoffgehalt in der stark durchbluteten Choriokapillaris der Aderhaut entstehen durch Photooxidation freie Radikale in hohem Ausmaß (17). Das RPE verfügt über enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien (18, 19) sowie über Reparaturmechanismen für geschädigte DNA, Lipide und Proteine. Durch die hohe Energieaufnahme in den Melanosomen kommt es zu einer Erhitzung des RPE auf über 40°C (20), die Wärme wird über die stark durchblutete Aderhaut abtransportiert.

Das RPE bildet außerdem über seine dichten „*tight junctions*“ die äußere Blut-Retina-Schranke und sezerniert immunmodulatorische Faktoren (z.B. Interleukin-8 und Komplement-Faktor H) (21, 22), was unter anderem zum Immunprivileg des Auges beiträgt. Dazu kommen weitere sekretorische Funktionen, z.B. die Sekretion des neuroprotektiven und anti-angiogenen *pigment epithelium derived factor PEDF* (23) oder des vasoaktiven und anti-apoptotischen *vascular endothelial growth factor VEGF* (24), und ionale Homöostase-Funktionen (v.a. Kalium-Homöostase) im subretinalen Raum. Das RPE transportiert transepithelial Nährstoffe aus dem Blutstrom in Richtung der Photorezeptoren (25) und Wasser aus dem subretinalen Raum in Richtung Blutseite (26). Letzteres wird durch einen aktiven Transport von Chlorid-Ionen angetrieben, was wiederum zu einer Potentialdifferenz zwischen der apikalen und der basolateralen Seite des Epithels führt (27). Diese besteht in einem basolateral negativen transepithelialen Potential. Dadurch ist der hintere (*posteriore*) Pol gegenüber dem vorderen (*anterioren*) Pol des Auges negativ geladen, wodurch das Auge wie ein elektrischer Dipol in einem elektrischen Feld erscheint (28). Dies kann als sogenanntes Bestandpotential im Elektrokulogramm (EOG) elektrophysiologisch erfassen werden.

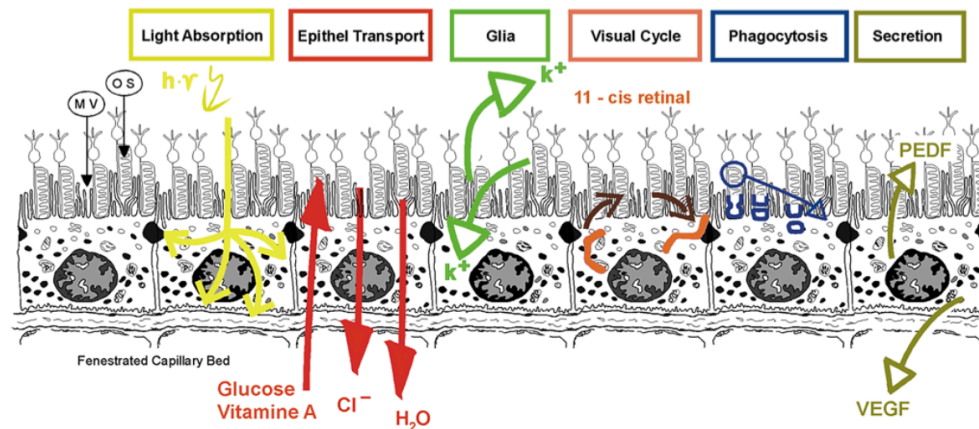


Abb. 4 Die Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Dargestellt werden die Funktionen des retinalen Pigmentepithels.

Von links nach rechts: Lichtabsorption, transepithelialer Transport, ionale Homöostase (Glia-Funktion), Retinalzyklus, Phagozytose und Sekretion.

VEGF: vascular endothelial growth factor, PEDF: pigment epithelium-derived factor

(Quelle: Strauß O (13))

1.4 Elektrookulogramm (EOG)

Das EOG dient als elektrophysiologisches Diagnostikum für die Funktionen des RPE und misst indirekt das transepitheliale Potential des RPE, indem es das Bestandpotential zwischen Hornhaut und hinterem Pol über Hautelektroden am inneren und äußeren Kanthus des Auges ableitet. Durch wiederholte horizontale Augenbewegungen wird der Dipol Auge im elektrischen Feld bewegt und es entstehen an den Elektroden im Wechsel positive und negative Ausschläge (28) (siehe Abb. 5).

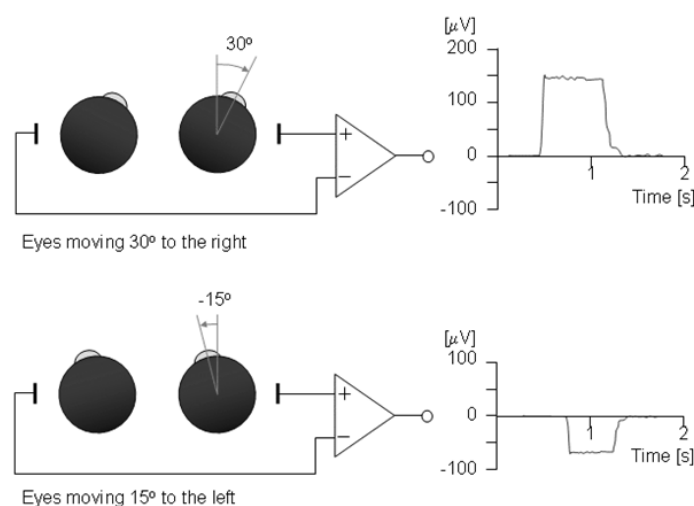


Abb. 5 Änderung des im EOG abgeleiteten Bestandpotentials in Abhängigkeit von der Augenbewegung

Dargestellt ist der Wechsel zwischen positiven und negativen Ausschlägen je nach Blickrichtung der Augen (oben: nach rechts, unten: nach links). Die Amplitude des Ausschlags ist abhängig vom Grad der Augenbewegung. Standardgemäß wird zur Durchführung des EOG ein Winkel von jeweils 15° links und rechts vom Zentrum gewählt.

(Quelle: (29) Abbildung angelehnt an Shakel B (28))

Das Bestandspotential ändert sich entsprechend den Stoffwechsellanforderungen an das RPE, da diese mit einer erhöhten Chlorid-Leitfähigkeit über die RPE-Basalmembran einhergehen (30). Somit lässt sich bei Gesunden während einer initialen 15-minütigen Dunkeladaptationsphase ein Abfall und nach dem Wechsel auf eine 15-minütige Hellphase nach etwa sieben Minuten ein sogenannter Hellanstieg des Bestandspotentials beobachten (31) (siehe Abb. 6).

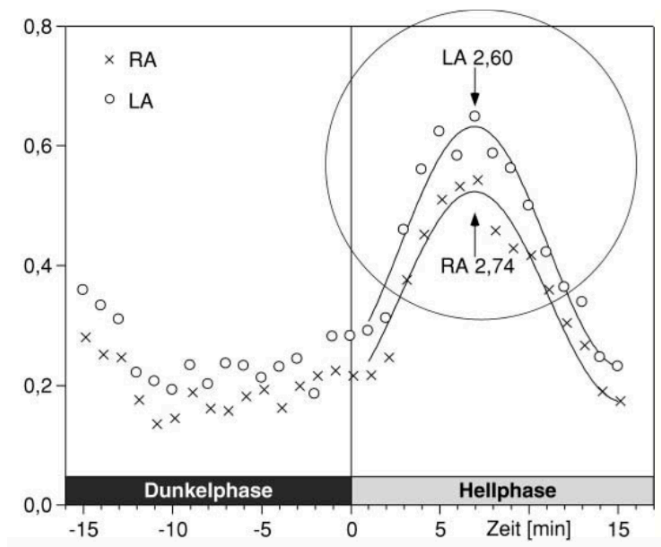


Abb. 6 Normales EOG

Abnahme des Bestandspotentials während der Dunkelphase und anschließender deutlicher Hellanstieg während der Hellphase.

(Quelle: Bach M et Kellner U (32))

Ein reduzierter Hellanstieg im EOG in Abwesenheit von Pathologien im Ganzfeld-Elektroretinogramm ist dabei charakteristisch für eine bestimmte hereditäre Makuladerkrankung: Morbus Best (30, 33–40). Hier dient das EOG neben der genetischen Analyse als wegweisendes Diagnostikum, insbesondere bei klinisch gesunden Genträgern (32).

1.5 Morbus Best

Die Juvenile vitelliforme Makuladystrophie (Morbus Best) wurde erstmals 1905 von dem deutschen Ophthalmologen Friedrich Best (1871-1965) beschrieben (41). Sie wird autosomal-dominant mit einer unvollständigen Penetranz und variablen Expressivität vererbt (42, 43). Der Erkrankungsbeginn ist ebenso variabel bis zur sechsten Lebensdekade, liegt aber in der Regel im Kindes- oder Jugendalter (38, 44–46). Es kommt zur vermehrten Ablagerung von gelbem Material (Lipofuszin) unter der Netzhaut, welche wahrscheinlich mit einer gestörten Funktion des RPE einhergeht (47, 48).

Funduskopisch unterscheidet man frühe Stadien, z.B. das pathognomonische vitelliforme Stadium mit „eidotterförmigen“ zentralen Ablagerungen (*siehe Abb. 7 links*), von späteren Stadien wie dem vitelliruptiven („rühreiförmigen“, *siehe Abb. 7 rechts*) oder dem atrophen Stadium (49). Zudem kann sich insbesondere im atrophen Stadium eine chorioidale Neovaskularisation ausbilden. Während in früheren Stadien eine Visusminderung noch ausbleiben kann (50), kommt es in den späteren Stadien zu reduzierter Sehschärfe, zu Metamorphopsien und zum Zentralskotom (51).

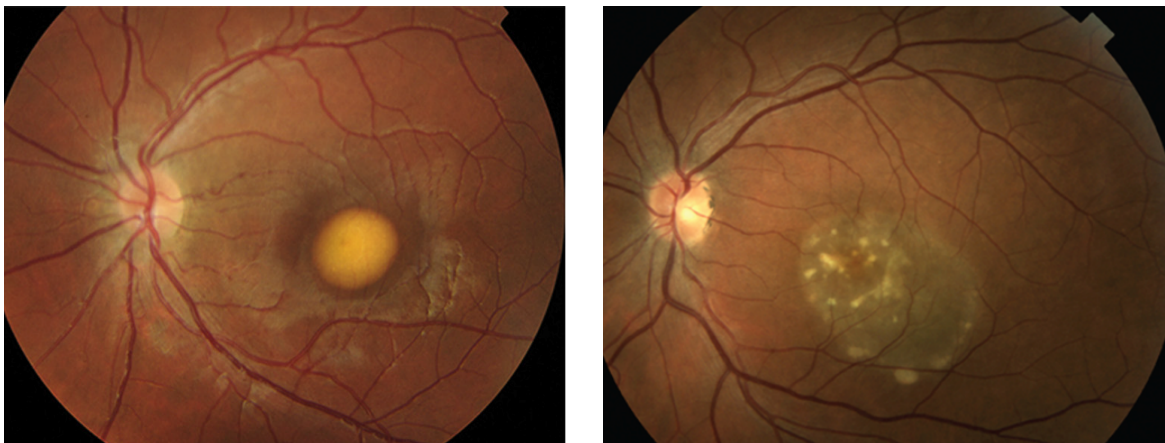


Abb. 7 Veränderungen am Augenhintergrund bei Morbus Best

Links: Funduskopischer Befund eines linken Auges bei Morbus Best im Stadium 2 (nach Gass) mit typischer "eidotterförmiger" Veränderung. (Quelle: Arora R *et al.* (52))

Rechts: Funduskopischer Befund eines linken Auges bei Morbus Best im Stadium 4 (nach Gass) mit "rühreiförmiger" Veränderung. (Quelle: Kovach JL *et al.* (53))

Wie unter 1.4 beschrieben, ist für Morbus Best ein reduzierter Hellanstieg im EOG typisch, es wurden allerdings auch Fälle beschrieben, bei denen das EOG trotz Fundusauffälligkeiten und teils sogar vermindertem Elektroretinogramm keine Pathologien zeigte (45, 54). In solchen Fällen erweist sich die genetische Untersuchung diagnostisch als hilfreicher.

1.6 Bestrophin-1 und *BEST1*

Ursächlich für die Erkrankung ist eine Mutation im humanen Bestrophin-1-Gen *BEST1* (früher: *VMD2*), welches für das Protein Bestrophin-1 kodiert (42, 43). Bislang wurden mehr als 200 krankheitsverursachende Mutationen beschrieben (55).

Neben Morbus Best gibt es weitere „Bestrophinopathien“, also Erkrankungen, welche durch eine Bestrophin-1-Mutation hervorgerufen werden. Dazu werden die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) (56), die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (ARB) (57), die adulte vitelliforme Makuladystrophie (AVMD) (58, 59) und die Retinopathia pigmentosa (RP) (60) gezählt.

Das Genprodukt Bestrophin-1 wird innerhalb des Auges nur im RPE exprimiert (61) und es wird ihm eine duale Funktion zugeschrieben: Es fungiert zum einen als Calcium-abhängiger Chlorid-Kanal (62–69), zum anderen reguliert es die intrazelluläre Calcium-Homöostase und das intrazelluläre Calcium-*Signaling* in den RPE-Zellen (57, 64, 70–79).

1.7 Calcium-*Signaling* und der speicherabhängige Calcium-Einstrom (SOCE) im RPE

Intrazelluläres Calcium entweder direkt oder in seiner Funktion als sekundärer Botenstoff gilt wie in allen Zellen auch im RPE als einer der bedeutendsten Regulatoren seiner Funktionen. Darüber werden wichtige Prozesse wie Phagozytose, transepithelialer Ionen- und Wassertransport, Sekretion und Zelldifferenzierung gesteuert (80–83). Das RPE exprimiert in diesem Zusammenhang zahlreiche Calcium-Kanäle:

Den spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanal $Ca_v1.3$ (84–87), den Calciumspeicher-abhängigen Orai1-Kanal (87–89) und die Calcium-leitenden Kationen-Kanäle TRPV (90, 91) und TRPC (92). Die intrazelluläre Calcium-Konzentration resultiert aus einem fein abgestimmten Zusammenspiel aus transmembranem Calcium-Einstrom über plasmamembranständige Calcium-Kanäle und der Freisetzung aus intrazellulären Calcium-Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), Mitochondrien, sauren Endosomen oder Melanosomen (93). Bereits kleine Veränderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration können starke Auswirkungen auf die zellulären Funktionen haben. Die Spezifität eines Calcium-Signals für eine bestimmte Zellfunktion wird durch Amplitude und zeitlichen Verlauf des Calcium-Signals kodiert. Dieses Muster wird durch die Verwendung unterschiedlicher Ionenkanäle und Calcium-Quellen je nach Regulationsmechanismus erzeugt.

Einer der bedeutendsten Mechanismen des Calcium-*Signaling* im Allgemeinen, beschrieben in einer Vielzahl von Zell-Typen, ist der speicherabhängige Calcium-Einstrom (*engl.: store-operated calcium entry*, SOCE) (94). Ihm werden eine wichtige Rolle in der Gen-Expression, im Zellmetabolismus, Zellwachstum und -proliferation, Exozytose u.v.m. zugesprochen (94–96). Aberrantes Calcium-*Signaling* infolge einer Störung des SOCE kann andererseits Malignomen, wie z.B. Mamma- oder Cervix-Carcinom (97–104), oder genetischen Erkrankungen zugrunde liegen. Eine Mutation der am SOCE beteiligten Calcium-Kanal-Untereinheit Orai1 führt aufgrund gestörter T-Zell-Funktion zur autosomal-

rezessiv vererbten Immundefizienz-9 (IMD-9) (105) und zur autosomal-dominant vererbten „*tubular aggregate*“ Myopathie (TAM2) (106).

Der SOCE verbindet die beiden Mechanismen des Anstiegs von zytosolischem Calcium, nämlich Einstrom von extrazellulär und Freisetzung aus intrazellulären Speichern:

Die Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher aus dem endoplasmatischen Retikulum - physiologischerweise vermittelbar durch eine Vielzahl von Signalkaskaden, wie den IP₃-Signalweg, über Ryanodin-Rezeptoren, Thapsigargin-abhängig oder Bafilomycin-abhängig (107) - aktiviert einen Calcium-Einstrom in die Zelle über zellmembranständige speicherabhängige Calcium-Kanäle (SOC (*store operated calcium*)-Kanäle bzw. CRAC (*calcium release activated calcium*)-Kanäle). Diese Kanäle werden allein durch abfallende Calcium-Konzentrationen im ER, nicht durch zytosolisches Calcium oder andere Botenstoffe oder Mechanismen aktiviert. Dies trifft auf Orai1 (benannt nach den „Horen“, *altgriechisch Hōrai*, Göttinnen der griechischen Mythologie, die das geregelte Leben überwachen (105)) als wesentliche porenbildende Untereinheit des CRAC-Kanals zu, mit Einschränkungen auch auf TRPC-Kanäle (107). Die Kommunikation zwischen den intrazellulären Calcium-Speichern und Orai1 wird durch das Protein STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) vermittelt (*siehe Abb. 8*). STIM1-Proteine befinden sich in der Membran des ER und ändern ihre Konformation je nach Calcium-Füllzustand des intrazellulären Speichers. Hierbei dient ihre ins ER-Lumen ragende Calcium-bindende EF-Hand-Domäne als Calcium-Sensor. Bei einer ausreichenden Füllung der Speicher sind die STIM1-Proteine homogen über die gesamte Membran des ER verteilt, bei einer Entleerung der Speicher akkumulieren sie an Stellen nahe der Plasmamembran. Gleichzeitig translozieren auch Orai1-Proteine in der Plasmamembran in die Nähe der akkumulierten STIM1-Proteine, so dass Orai1 von STIM1 aktiviert und geöffnet werden kann und der Einstrom extrazellulären Calciums ermöglicht wird. Zusätzlich kann dieser Calcium-Einstrom auch TRPC-Kanäle mit STIM1 in Interaktion treten lassen, so dass der Calcium-Einstrom verstärkt wird (108).

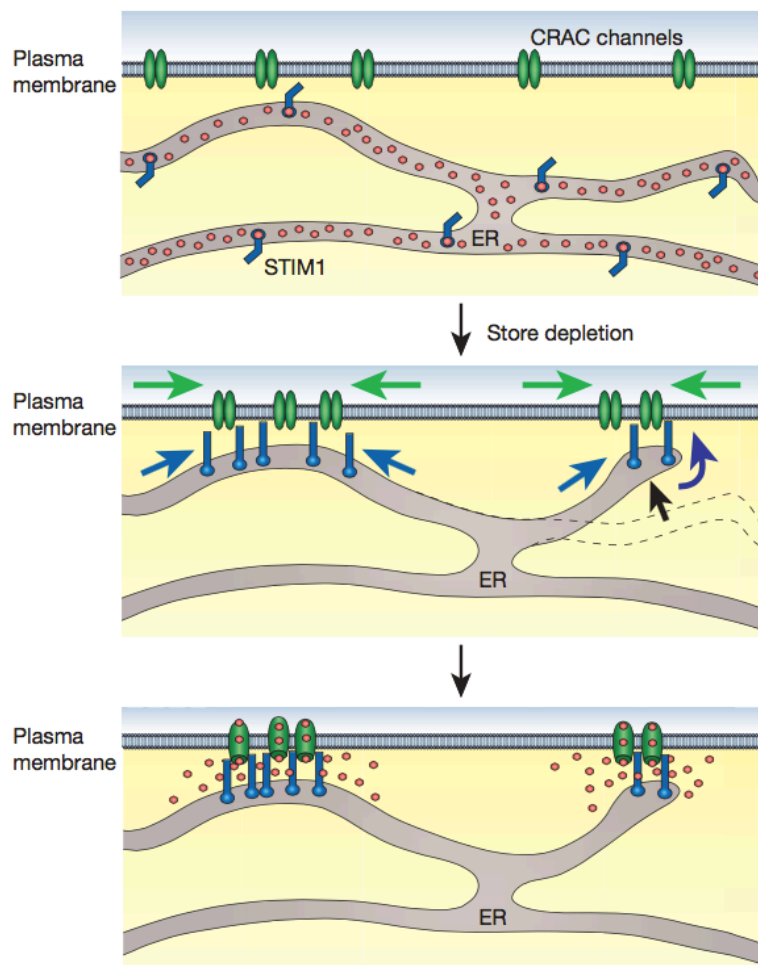


Abb. 8 Die funktionellen Einheiten des speicherabhängigen Calcium-Einstroms (SOCE): STIM1 und Orai1.

Oben: gefüllte ER-Calcium-Speicher mit einer homogenen Verteilung von STIM1 in der ER-Membran und Orai1 in der Plasmamembran; *Mitte:* Nach Entleerung der ER-Calcium-Speicher Translokation von STIM1 in Richtung Plasmamembran-naher Bereiche und von Orai1 in Richtung von STIM1; *unten:* Aktivierung von Orai1 durch STIM1 mit nachfolgendem Einstrom von extrazellulärem Calcium.

(Quelle: Lewis RS (107))

Über den SOCE-Mechanismus können intrazelluläre Calcium-Speicher wiederaufgefüllt, verlängerte Calcium-Signale aufrechterhalten und eine konstante Amplitude von repetitiven Calcium-Oszillationen gewährleistet werden (89).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten auch in retinalen Pigmentepithelzellen einen speicherabhängigen Calcium-Einstrom nachweisen (88, 89, 109–111). Ihm werden Funktionen wie Phagozytose, Ionen- und Wassertransport, Sekretion von Zytokinen und Zelldifferenzierung zugeschrieben (83). Cordeiro *et* Strauß zeigten durch Experimente an ARPE-19-Zellen erstmals, dass dieser Calcium-Einstrom über eine Stim1/Orai1-Interaktion aktiviert wird (89). Es zeigten sich die für Orai1 typische Reduktion der SOCE-Amplitude (um 79%) durch

den Einsatz von hochdosiertem 2-APB (75 μ M) sowie eine Steigerung durch niedrigdosiertes 2-APB (2 μ M). Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse durch Mas *et al.* in primären Schweine-RPE-Zellen, wo eine Blockade von Orai1 mit 2-APB (75 μ M) bzw. die Behandlung der Zellen mit Orai-1 siRNA zu einer Reduktion der SOCE-Amplitude um 87% bzw. 65% verglichen mit unbehandelten Zellen führte (88). Orai1-Kanäle sind also ganz maßgeblich am SOCE in RPE-Zellen beteiligt.

1.8 L-Typ-Calcium-Kanäle und ihre Beteiligung am SOCE – Beeinflussung durch Bestrophin-1?

L-Typ-Calcium-Kanäle (LTCC) gehören zur Familie der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle. Weitere Vertreter der Familie sind P-/Q-, N-, R- und T-Typ-Calcium-Kanäle. Allen gemeinsam ist neben ihrer Aktivierung durch eine Plasmamembran-Depolarisation der Aufbau aus einer porenbildenden Untereinheit und weiteren regulatorischen Untereinheiten (Ausnahme T-Typ: nur porenbildende Einheit). Die Einteilung in eine Subgruppe erfolgt anhand der porenbildenden α 1-Untereinheit: Cav1.1-1.4 (L-Typ), Cav2.1 (P-/Q-Typ), Cav2.2 (N-Typ), Cav2.3 (R-Typ) und Cav3.1-3.3 (T-Typ). Innerhalb der Gruppe der L-Typ-Calcium-Kanäle findet sich der Sub-Typ Cav1.1 überwiegend in Skelettmuskelzellen, Cav1.2 in Kardiomyozyten und glatter Muskulatur, Cav1.3 im Pankreas und auch in RPE-Zellen, neuronalen Zellen und Cochlea-Haarzellen und Cav1.4 in retinalen Zellen und in Mastzellen (112).

Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass sich neben Orai1 auch LTCC am SOCE maßgeblich beteiligen: T-Zellen von Cav1.4-defizienten Mäusen weisen einen verminderten SOCE verglichen mit T-Zellen von Wildtyp-Mäusen auf (113). In Kardiomyozyten transgener Mäuse mit einer Überexpression von *STIM1* zeigt sich im Alter von zwei Monaten eine erhöhte Aktivität von LTCC vom Cav1.2-Typ (114).

Hingegen lässt sich aus einer Arbeit von Hu *et al.* indirekt ableiten, dass in primären Ratten-Osteoblasten, in welchen LTCC vom Cav1.2-Typ vorherrschend vertreten sind (115), der SOCE von LTCC nicht beeinflusst wird (116): In den Osteoblasten kann über erhöhte extrazelluläre Calcium-Konzentrationen ein starker intrazellulärer Calcium-Anstieg getriggert werden, welcher zwar durch die SOCE-Blocker 2-APB (25 μ M) und BTP-2 nahezu vollständig inhibiert wird, sich jedoch unbeeinflusst vom LTCC-Blocker Nifedipin zeigt.

Bei Ratten-Osteoblasten ist also die Aktivität von Orai1 entscheidend am SOCE beteiligt, wohingegen LTCC keinen Einfluss auf den SOCE haben.

In anderen Publikationen wird wiederum ein inhibitorischer Effekt von STIM1 auf LTCC beschrieben: Es wurde von Park *et al.* und Wang *et al.* berichtet, dass STIM1 unmittelbar im *Whole cell Patch Clamp* die Stromamplituden von Cav1.2-LTCC reduzierte (117, 118), sowie langfristig zur Internalisierung von Cav1.2-LTCC führte (118). In beiden Arbeiten zeigte sich eine Co-Lokalisation von STIM1 und Cav1.2 im Bereich der ER-Plasmamembran-Junktionen. Nohare *et al.* bzw. Omilusik *et al.* postulierten ebenso, dass in T-Lymphozyten mit starkem T-Zell-Rezeptor-*Signaling* eine STIM1-Aktivierung zur Inhibition von LTCC vom Cav1.4-Typ führe, wohingegen eine schwache T-Zell-Rezeptor-Aktivierung durch fehlende STIM1-Aktivierung aktivierend auf Cav1.4 und inhibierend auf Orai1 wirke (119, 120).

Ein erster wichtiger Teilaspekt der vorliegenden Arbeit sollte es sein zu prüfen, ob LTCC am SOCE in RPE-Zellen, stellvertretend in der humanen RPE-Zelllinie ARPE-19, beteiligt sind.

In einem weiteren Schritt sollte in dieser Arbeit beleuchtet werden, inwiefern Bestrophin-1 und Bestrophin-1-Mutanten den SOCE bzw. die Beteiligung von LTCC am SOCE beeinflussen. Bestrophin-1 wird wie unter 1.6 vermerkt eine Rolle im Calcium-*Signaling* in RPE-Zellen zugeschrieben, der exakte Mechanismus ist hierbei jedoch noch nicht verstanden. Strukturell und funktionell ist über Bestrophin-1 bekannt, dass es über seinen C-Terminus physikalisch mit der beta-Untereinheit von LTCC interagiert (79, 121, 122). Diese Interaktion reguliert die Zahl der porenbildenden Untereinheiten sowie die Aktivität dieser Poren. Ein potentieller Pathomechanismus bei Morbus Best wäre ein durch Bestrophin-Mutation veränderter SOCE in RPE-Zellen bzw. eine veränderte Beeinflussung des SOCE durch LTCC. Es konnte belegt werden, dass die Interaktion zwischen Bestrophin-1 und LTCC durch eine Mutation von Bestrophin-1 verändert wird (57, 77, 79). Daher war es auch interessant zu untersuchen, ob mutantes Bestrophin-1 den SOCE bzw. den LTCC-Anteil am SOCE beeinflusst.

In den folgenden Kapiteln wird die Wahl des eingesetzten Calcium-Kanal-Blockers, der verwendeten Zelllinie und der untersuchten Bestrophin-1-Mutanten näher erläutert.

1.8.1 Die Pharmakologie des Dihydropyridin-Derivats (R)-(+)-Bay K 8644

LTCC sind als einzige Vertreter der Familie der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle Dihydropyridin-sensitiv. Zur Inhibition von LTCC wurde in dieser Arbeit das Dihydropyridin-Derivat (R)-(+)-Bay K 8644 eingesetzt. Bei der Wahl der eingesetzten Konzentration sollte Folgendes beachtet werden: der Cav1.3-Subtyp, welcher in ARPE-19-Zellen (123) sowie weiteren RPE-Zelllinien und Primärkulturen aus frisch-isolierten RPE-Zellen (85, 123) vorherrschend exprimiert wird, weist verglichen mit dem Cav1.2-Subtyp eine relativ niedrige Sensitivität gegenüber Dihydropyridinen auf. Es wird hierbei davon ausgegangen, dass bei Cav1.3-Kanälen nicht eine verminderte Affinität zur Dihydropyridin-Bindetasche zur verminderten Dihydropyridin-Sensitivität führt, sondern dass ein noch nicht näher spezifizierter Mechanismus zugrunde liegt, der Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit zwischen Cav1.3 und Cav1.2 beinhaltet (124).

Koschak *et. al* zeigten, dass durch das Dihydropyridin-Analogon Isradipin Cav1.2-Kanäle zu 100%, Cav1.3-Kanäle hingegen nur zu 30-40% inhibiert werden konnten (124). Ähnlich verhielt es sich bei Engel *et al.* für Nifedipin: Zur kompletten Blockade von Cav1.2-Kanälen waren 100 nM Nifedipin ausreichend, wohingegen sogar eine Steigerung der Dosis auf 10 µM lediglich zur Blockade von 44% von Cav1.3-Kanälen in Mäuse-Cochlea-Haarzellen führte (125). In einer weiteren Studie inhibierte Nifedipin (10 µM) in äußeren Cochlea-Haarzellen von neonatalen Mäusen Cav1.3-Kanäle zu ca. 34% (126). Vergleichbare Werte ergeben sich für Nimodipin (10 µM), nämlich eine Blockade von ca. 40% in Mäuse-Cochlea-Haarzellen (125, 127). Lediglich in einer Studie an RPE-J-Zellen konnten geringfügig höhere Werte von 65% durch 10 µM Nifedipin erreicht werden (77).

Zu beachten ist, dass in diesen Studien die Dihydropyridin-Analoga Nifedipin, Nimodipin, Isradipin, jedoch nicht (R)-(+)-Bay K 8644 zur LTCC-Blockade eingesetzt wurden. Zur Sensitivität von Cav1.3 gegenüber (R)-(+)-Bay K 8644 liegen weniger Studien vor, jedoch geht auch aus diesen hervor, dass Cav1.3-Kanäle durch 10 µM (R)-(+)-Bay K 8644 nur zu etwa 50% gehemmt werden (128). Der inhibitorische Effekt von (R)-(+)-Bay K 8644 auf LTCC wurde erstmals 1985 von Franckowiak *et al.* in Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen, in welchen der Cav1.2-Subtyp vorherrscht, belegt (129) und wurde darauf folgend in anderen Studien ebenso zur Blockade von Cav1.2-LTCC eingesetzt (130–133). In seiner racemischen Form (Gemisch seiner Isoformen (R)-(+)-Bay K 8644 und (S)-(-)-Bay K 8644) ist (+/-)-Bay K 8644 hingegen seit 1983 als Dihydropyridin-Derivat und

LTCC-Agonist bekannt. Es wurde in vielen Studien eingesetzt, um die Präsenz von LTCC in verschiedenen Zelltypen und Geweben nachzuweisen (134, 135). Eine Kanalaktivierung durch (+/-)-Bay K 8644 wird als hochspezifische Eigenschaft von LTCC gesehen (126). So auch bei Cav1.3-LTCC, wo sich abhängig vom untersuchten Zelltyp in *Patch Clamp*-Experimenten ein Anstieg des Barium-Einwärtsstroms (I_{Ba}) um das 1,4-fache (primäre Ratten-RPE-Zellen (85)) bis 7,5-fache (tsA-201-Zellen, transfiziert mit der humanen Cav1.3-alpha1-Untereinheit (124)) zeigte (85, 124, 136). Bei Cav1.2-LTCC kommt es ebenso zu Steigerungen des Ionenstroms durch LTCC (137–142). Der Anstieg wurde im Rahmen dieser Veröffentlichungen nur teilweise quantifiziert, bei Gomez *et al.* zum Beispiel zeigte er sich in Ratten-Kardiomyozyten um das 1,9-fache (reife Zellen) bis 2,3-fache (zwei Tage alte neonatale Zellen) erhöht (137). Das Ausmaß der agonistischen Wirkung des Racemats (+/-)-Bay K 8644 ist folglich eher abhängig vom Gewebe- und Zell-Typ sowie Zellalter als vom Cav-Subtyp.

1.8.2 Die humane RPE-Zelllinie ARPE-19

ARPE-19-Zellen sind humane RPE-Zellen, welche 1986 aus den Augen eines gesunden 19-Jährigen (Todesursache: Schädeltrauma bei einem Verkehrsunfall (143)) isoliert und durch spontane Immortalisierung zur stabilen Zelllinie herangezüchtet wurden (144). Es handelt sich um eine spontane Zelllinie eines humanen Spenders, die wesentliche Eigenschaften des RPE etwa in Bezug auf Polarisierung und Expression von Ionen-Kanälen und Transportern über eine etliche Zahl an Passagen aufrechterhält (145). Daher hat sie sich als *in-vitro*-Modell für das humane RPE etabliert.

Die ARPE-19-Zelllinie bildet zwar auf DNA-Ebene Bestrophin-1 mRNA, weist aber auf Proteinebene kein Bestrophin-1 auf (61) und dient somit als RPE-Bestrophin-*knock-out*-Modell. Hier liegt auch ein bedeutender Vorteil und der Grund, weshalb die ARPE-19-Zellen als Zellmodell ausgewählt wurden: Diese „Bestrophin-leeren RPE-Hüllen“ eignen sich besonders gut für eine Überexpressionsstudie zur *BEST1*-Expression. Überexpressionsstudien stellen ein effizientes Werkzeug dar, um generelle Hypothesen zu prüfen, also ein „*proof-of-principle*“ zu erstellen. Zudem besteht in diesen Zellen nach der Transfektion mit mutanten Bestrophinen keine Co-Existenz von endogenem Wildtyp Bestrophin. Eine mögliche Interaktion der transfizierten mutanten Bestrophine mit der Wildtyp-Kopie lässt sich dadurch ausschließen.

1.8.3 Protein-Lokalisation und Protein-Trafficking von Bestrophin-1 Wildtyp und Mutanten

Marmorstein *et al.* zeigten im Jahr 2000, dass Bestrophin-1 an der basolateralen Membran von RPE-Zellen lokalisiert ist (61). Dies konnte in weiteren Veröffentlichungen bestätigt werden (76, 146–149).

Verändertes Protein-Trafficking wird als einer der zugrundeliegenden Mechanismen für den Funktionsverlust von mutiertem Bestrophin angesehen. Milenkovic *et al.* untersuchten die Lokalisation von 13 Bestrophin-1-Mutationen in polarisierten MDCKII-Zellen, einem etablierten Zellmodell für Protein-Trafficking-Experimente. Während die Mehrheit der Mutanten die Zellmembran nicht erreichte, sondern im Zytosol verblieb, darunter die Mutationen T6P und F305S, gab es ebenso wenige Mutanten, die zwar an der basolateralen Membran lokalisiert waren, jedoch nicht effektiv in die Membran integriert werden konnten. Ausschließlich die Mutation R218C zeigte sich gut in die basolaterale Zellmembran integriert und wies dadurch in Hinsicht auf das Protein-Trafficking vergleichbare Eigenschaften zum Wildtyp-Bestrophin auf (150).

Diese Ergebnisse aus der Arbeit von Milenkovic *et al.* wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Wahl der in den durchgeführten Experimenten eingesetzten Bestrophin-1-Mutanten berücksichtigt. Die Mutationen T6P und F305S wurden als Stellvertreter für fehlgeschlagenes Protein-Trafficking und die Mutation R218C als Vertreter für eine membranständige Lokalisation ausgewählt. Die Mutation F305 nimmt zudem eine Sonderstellung ein, da sie zu besonders starken Trafficking-Defekten führt.

Ziel der Arbeit war es, nicht nur eine Beeinflussung des SOCE bzw. der LTCC-Beteiligung am SOCE durch Bestrophin-Mutationen zu untersuchen, sondern in einem weiteren Schritt etwaige Unterschiede im Ausmaß der Beeinflussung je nach eingesetzter Mutation mit einem unterschiedlichen Protein-Trafficking der Mutanten zu korrelieren.

2 Material

Tab. 1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Zur allgemeinen Verwendung		
Pasteurpipetten (Kalksoda-Klarglas)	Carl Roth GmbH	4522.1
PCR 0,2 mL Strip Tubes	Thermo Scientific	SP-0020
Pipettenspitzen 1000 µL	Sarstedt AG	70.762
Reaktionsgefäß 200 µL	nerbe plus GmbH	04-010-0100
Reaktionsgefäß 1,5 mL	Sarstedt AG	72.690.001
Reaktionsgefäß 2 mL Safe-Lock	Eppendorf	0030 120.094
Zentrifugen-Röhrchen 50 ml	Corning Inc.	430829
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml	Corning Inc.	430791
Zellkultur		
12-Well-Platten	Costar, Corning Inc.	3513
Deckgläser „Menzel“, Durchmesser 18 mm	Thermo Scientific	CB00180RA1
Zellkulturflaschen 75 cm ²	SPL Life Sciences Co.	70075
Zellkulturflaschen 25 cm ²	TPP Techno Plastic Products AG	90026
Zellkulturplatten 100 x 20 mm	SPL Life Sciences Co.	20101
Western Blot		
Membran Amersham Hybond-P	GE Healthcare	RPN303F
Zellspachtel	TPP Techno Plastic Products AG	99010
Immunfluoreszenzmikroskopie		
Objektträger „ELKA“	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG „Assistent“	2406
Calcium Imaging		
Baysilone-Paste, Schliffett mittelviskos	GE Bayer Silicones	1063002

Tab. 2 Chemikalien, Kit-Systeme, Enzyme und Medien

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Klonierung		
5x Puffer Green GoTaq	Promega Co.	M7891A
10x Puffer für PfuUltra II	Stratagene	600670-52
10x Puffer für T4 DNA-Ligase	NEB New England BioLabs	B0202S
100x BSA	NEB New England BioLabs	B9000S
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH	2267.4
beta-Mercaptoethanol	Stratagene	210200-43
Deoxynukleotid-Mix (dNTP)	NEB New England BioLabs	N0447S
Ethidiumbromid-Lösung 0,07%	AppliChem GmbH	A2273,0005
Gelextraktions-Kit „NucleoSpin Extract II“	Machery-Nagel GmbH	740609.250
GoTaq DNA Polymerase	Promega Co.	M830A
„High Pure“ Extraktions-Kit für Plasmide	Roche Diagnostics GmbH	11 754 785 001
PfuUltra II Fusion Hotstart DNA-Polymerase	Stratagene	600670-51
Plasmid Midi Kit	Qiagen	12143
Quick-Load 2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb)	NEB New England BioLabs	N0469S
T4 DNA-Ligase	NEB New England BioLabs	M0202S
XL1-Blue Competent Cells	Stratagene	200249
Zeocin (Antibiotikum)	Invitrogen	46-0509
Zellkultur		
DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH	E15-813
UltraPure™ 0,5 M EDTA, pH 8,0	Gibco, Invitrogen Co.	15575-038
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich Co.	F7524-500ML
Natriumbikarbonat 7,5%	PAA Laboratories GmbH	S11-002
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH	H15-002
Penicillin/Streptomycin (x100) (10.000 units/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin)	PAA Laboratories GmbH	P11-010
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Co.	L11-003

Transfektion

Lipofectamine 2000 Reagent (1 mg/mL)	Invitrogen	11668-019
Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (1X), liquid	Gibco, Invitrogen Co.	31985-047

Western Blot

Acrylamid-Lösung (30%)	AppliChem GmbH	A3626,1000
beta-Mercaptoethanol	Stratagene	210200-43
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Co.	D8537
Magermilchpulver	AppliChem GmbH	A0830,1000
Methanol	Merck KgaA	1060072500
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	32106
Protease-Inhibitor „complete Mini“ Tabletten	Roche Diagnostics GmbH	11 836 153 001
Protein-Marker IV peqGOLD	PEQLAB Biotechnologie GmbH	27-2110
Tween 20 BioChemica	AppliChem GmbH	A1389,0500

Immunfluoreszenzmikroskopie

Eindeckmedium „Dako Fluorescent Mounting Medium“	Dako	S3023
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Co.	D8537
Triton X 100	Carl Roth GmbH	3051.3
Tween 20 BioChemica	AppliChem GmbH	A1389,0500
Ziegen Serum	PAA Laboratories GmbH	B11-035

Calcium Imaging

(R)-(+)-Bay K 8644	Tocris Bioscience	1545
(R)-(+)-Bay K 8644	Sigma-Aldrich Co.	B132
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH	A119.1
Calcium D-Gluconat Monohydrat, Minimum 98%	Sigma-Aldrich Co.	G4625-1KG
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck KgaA	1.08342.1000

di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck KgaA	1.05099.1000
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co.	41640
EGTA	AppliChem GmbH	A0878,0100
fura-2, AM, cell permeant	Invitrogen Co.	F1221
Ionomycin	Sigma-Aldrich Co.	I0634
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KgaA	1.04873.1000
Natriumchlorid	Merck KgaA	1.06404.1000
Natronlauge	Merck KgaA	1.09137.1000
Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (1X), liquid	Gibco, Invitrogen Co.	31985-047
Pluronic F-127 (10% w/v in H ₂ O)	Invitrogen, Co.	P6866
Salzsäure	Merck KgaA	1.09060.1000
Thapsigargin	Sigma-Aldrich Co.	T9033

Tab. 3 Ausgangsplasmide

Plasmid	Herkunft
pBudCE4.1	<i>Freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt</i>
pcDNA3.1-YFP	<i>Freundlicherweise von Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann, Institut für Physiologie, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt</i>
pcDNA3.1-hbest1WT	<i>Freundlicherweise von Prof. Dr. Alan D. Marmorstein zur Verfügung gestellt</i>
pcDNA3-hbest1T6P pcDNA3-hbest1R218C pcDNA3-hbest1F305S	<i>Freundlicherweise von Dr. rer. nat. Vladimir Milenkovic zur Verfügung gestellt</i>

Tab. 4 Für PCR und Sequenzierung verwendete Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
Primer für PCR		
BGH-R	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'	Invitrogen
hVMD2-369-F	5' AATAAGCCCAGCCACAGCC 3'	Biomers.net GmbH
Sca-YFP-F	5' TCAGTACTATG GTG AGC AAG GGC GAG 3'	Eurofins MWG Operon Inc.
T7-F	5' TAATACGACTCACTATAGG 3'	Biomers.net GmbH
YFP-Xba-R	5' TGTTCTAGATTACTTGACAGCTCGTCC 3'	Eurofins MWG Operon Inc.
Primer für Sequenzierung		
BGH-R	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'	Invitrogen
EF-1alpha-F	5' TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC 3'	Invitrogen
GFP-R	5' GGGTAAGCTTCCGTATGTAGC 3'	Invitrogen
hbest1-286-F	5' TGTTGGCTGGCTGAAGGT 3'	Biomers.net GmbH
hVMD2-496-F	5' CAGGCATAGACACCAAAGAC 3'	MWG Biotech AG
pBud-R	<i>Freundliche Gabe von Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg; Sequenz unbekannt.</i>	
T7-F	5' TAATACGACTCACTATAGG 3'	Biomers.net GmbH

Tab. 5 Für Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie verwendete Antikörper unter Angabe der eingesetzten Konzentrationen

Antikörper	Konzentration	Hersteller	Katalognummer
Western Blot			
Primäre Antikörper			
anti-Bestrophin Antikörper (Maus monoklonal IgG)	1:3000	Abcam	ab2182
anti-GFP Antikörper (Maus monoklonal IgG)	1:2000	Abcam	ab291
anti-beta-Actin Antikörper (Maus monoklonal IgG)	1:5000	Abcam	ab6276
Sekundärer Antikörper			
Anti-mouse IgG, HRP-linked	1:5000	Cell Signaling Technology	7076S
Immunfluoreszenzmikroskopie			
Primärer Antikörper			
anti-Bestrophin Antikörper (Maus monoklonal IgG)	1:500	Abcam	ab2182
Sekundärer Antikörper			
Cy3 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:500	Invitrogen	A10521
Antikörper für Zellkerne			
Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate	1:1000	Thermo Scientific	H3570

Tab. 6 Geräte und Software

Produkt	Hersteller	Katalognummer/Modell
Zur allgemeinen Verwendung		
Spektrophotometer	Thermo Scientific	NanoDrop 1000
Spektrophotometer-Software	Thermo Scientific	NanoDrop 1000 Version 3.8.1
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer compact
Vortex Mixer	Janke und Kunkel IKA Labortechnik	VF2
Vortex Shaker	Janke und Kunkel IKA Labortechnik	Vibrax VXR Typ VX7
Waage	Kern	444-33
Wasserdestillationsgerät	Barnstead	D2750
Zentrifuge	Carl Roth GmbH	Rotilabo Mini
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415C
Klonierung		
Geldokumentationssystem	Alpha Innotech	FluorChem FC2
Gelelektrophorese-Vorrichtung	LABREPCO	Horizon 11-14
Inkubationsschüttler	Thermo Electron Corporation	Forma 420 Orbital Shaker
Inkubator	Memmert GmbH & Co. KG	
PCR Maschine	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Cyclone Gradient
Spannungsgerät für Gelelektrophorese	Biometra GmbH	PS305T
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH und Co. KG	Mikro 220R
Zellkultur		
Inkubator	Thermo Scientific	HERAcell 150
Mikroskop (invertiert)	Olympus Optical Co.	Olympus CK2-TR
Pipettierhilfe (akkubetrieben)	Hirschmann Laborgeräte GmbH	Pipetus
Sterile Werkbank	HERAsafe, Thermo Scientific	
Vakuum Aspirationssystem	INTEGRA Biosciences	Vacusaft
Wasserbad	Thermolab, GFL Gesellschaft für Labortechnik	1083
Zählkammer (Typ Neubauer)	A. Hartenstein	ZK03
Zentrifuge (Radius 16,9 cm)	Heraeus	Megafuge 1.0

Western Blot

Geldokumentationssystem	Alpha Innotech	FluorChem FC2
Mini-PROTEAN Tetra Cell and Mini Trans-Blot Module	Bio-Rad Laboratories GmbH	165-8029
Spannungsgerät für Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH	PowerPac Basic
Ultraschallgerät	Bandelin electronic GmbH & Co. KG	

Immunfluoreszenzmikroskopie

Mikroskop	Zeiss	Axio Observer.Z1
Imaging System	Visitron Systems GmbH	OptiGrid, VisiGRID
Software	Visitron Systems GmbH	VisiVIEW Imaging Software (Version 2.0.8)
Software	Open Source Software	ImageJ für Mac OS (Version 1.47b)

Calcium Imaging

Kamera	Photometrics	CoolSNAP EZ
Magnetrührer	Thermo Scientific	Variomag Poly 15
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG	MR 2002
Mikroskop (Invertiertes Fluoreszenz-)	Zeiss	Axiovert 35
Objektiv	Zeiss	Zeiss Fluor 40x/1.30 Oil immersion objective
pH-Messgerät	Mettler-Toledo Intl. Inc.	SevenEasy S20 Kit Version
Software	Universal Imaging Corporation	Metafluor, Version 7.1.3.0
Software	Microsoft Corporation	Microsoft Excel für Mac 2011 (Version 14.0.0)
Software	GraphPadSoftware, Inc.	Prism 6 for Mac OS X (Version 6.0f)
Software	GraphPadSoftware, Inc.	Prism 8 for Mac OS X (Version 8.0.0 (131))
VisiChrome High Speed Polychromator System		
Lichtquelle	Visitron Systems GmbH	Xenon Kurzbogenlampe 75W
Shutter	Ludl Electronic Product Ltd.	Mac5000 PS-System
Netzgerät	Visitron Systems GmbH	VisiChrome Lamp Power Supply

3 Methoden

Um das Ziel dieser Arbeit, die Untersuchung des Einflusses von Bestrophin-1 Wildtyp (WT) bzw. der entsprechenden Mutanten auf den SOCE und die Beteiligung von LTCC am SOCE in ARPE-19-Zellen, verfolgen zu können, wurde die Methode des Calcium Imaging mit dem Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) Fura-2 gewählt. Die verwendete Zelllinie ARPE-19 zeigt keine nachweisbare Präsenz von endogenem Bestrophin-1, weshalb eine Transfektion der Zellen mit Bestrophin-1 Wildtyp und Mutanten erfolgte. Zur Transfektionskontrolle sollte eine Co-Expression mit *YFP* (*yellow fluorescent protein*) dienen. Weder die Exzitations- noch die Emissionswellenlänge von YFP interferieren mit den Messungen von Fura-2. Es war zudem notwendig, dass *YFP* nicht an *BEST1* gekoppelt exprimiert würde, um das *Trafficking* von Bestrophin-1 nicht zu beeinflussen. Daher fiel die Wahl auf einen bicistronischen Vektor: *pBudCE4.1*. Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie wurden durchgeführt, um die Co-Existenz von Bestrophin-1 und YFP zu bestätigen.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Genauere Informationen zu den verwendeten Materialien und Geräten werden unter „2 Material“ und im Anhang gegeben.

3.1 Klonierung der bicistronischen Vektoren *pBudCE4.1-YFP* und *pBudCE4.1-YFP-hbest1(-Wildtyp und Mutanten)*

Zunächst soll das prinzipielle Vorgehen erläutert werden. Im Anschluss werden detaillierte Hinweise zu den Reaktionsansätzen und Protokollen gegeben. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter *Tab. 4* einsehbar.

3.1.1 Prinzipielles Vorgehen

Wie einleitend im Methodenteil beschrieben, wurde als Vektor für *BEST1* und die *BEST1*-Mutationen (T6P, R218C, F305S) *pBudCE4.1* gewählt. Als bicistronischer Vektor hat *pBudCE4.1* die Eigenschaft, dass über ihn zwei verschiedene Gene unabhängig voneinander exprimiert werden können, die daraus entstehenden Genprodukte (Proteine) also nicht aneinander gekoppelt sind und somit das Protein-*Trafficking* gegenseitig nicht beeinflussen. Die Expression beider Gene wird über zwei verschiedene Promotoren induziert, *CMV* (*Cytomegalievirus*) und *EF-1alpha* (*Elongationsfaktor-1alpha-Untereinheit*),

und erfolgt simultan. Ist eines der beiden Genprodukte ein fluoreszierendes Protein (in diesem Fall YFP), lässt sich die Präsenz des anderen Proteins, hier Bestrophin-1 bzw. die entsprechenden Mutanten, direkt im Fluoreszenzmikroskop ohne vorherige immunzytochemische Färbung nachweisen: zeigt sich eine Fluoreszenz der Zellen, so kann darauf geschlossen werden, dass auch Bestrophin-1 bzw. die entsprechenden Mutanten vorhanden sind. Das Protein-*Trafficking* von Bestrophin-1 (WT bzw. Mutanten) bleibt dabei von YFP unbeeinflusst.

Als Ausgangsplasmide dienten *pBudCE4.1*, *pcDNA3.1-YFP*, *pcDNA3.1-hbest1WT*, *pcDNA3-hbest1T6P*, *pcDNA3-hbest1R218C* und *pcDNA3-hbest1F305*.

Im ersten Schritt wurde die Klonierung von *YFP* in *pBudCE4.1* vorgenommen. Das entstehende Konstrukt wird als *pBudCE4.1-YFP* bezeichnet.

Die Ausgangsplasmide *pBudCE4.1* und *pcDNA3.1-YFP* wurden getrennt voneinander mit den Restriktionsenzymen *Scal* und *XbaI* verdaut, wobei *pcDNA3.1-YFP* zunächst mittels PCR-Technik um die Schnittstellen von *Scal* und *XbaI* elongiert werden musste (siehe 3.1.2). Die gewünschten Restriktionsprodukte (der geschnittene Vektor *pBudCE4.1* und das aus *pcDNA3.1-YFP* herausgeschnittene Insert *YFP*) wurden nach Gelelektrophorese gereinigt (siehe 3.1.4) und ligiert (siehe 3.1.5). Nach Transformation in *Escherichia coli* (siehe 3.1.6) wurden sogenannte „Kolonie-PCRs“ (siehe 3.1.7) sowie „Mini-preps“ durchgeführt (siehe 3.1.8). Danach erfolgte das Sequenzieren in Sanger-Technik, um die gewünschte Sequenz und den Erfolg der Klonierung zu bestätigen (siehe 3.1.9). Im Anschluss wurde von einem ausgewählten Klon eine „Midi-prep“ angesetzt (siehe 3.1.10) und es wurden Glycerin-Stocks zum Konservieren bei -80°C angelegt (siehe 3.1.11).

Das so entstandene Plasmid *pBudCE4.1-YFP* diene im Folgenden als Ausgangsplasmid für die Klonierungen von *BEST1* (WT und Mutanten).

Nach dem oben beschriebenen Prinzip entstanden die Plasmide *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT*, *pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P*, *pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C* und *pBudCE4.1-YFP-hbest1F305S* (als Restriktionsenzyme wurden für die Klonierung von *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* *XhoI* und *PmeI* verwendet, für die Klonierung von *pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P* (bzw. -R218C und -F305S) *KpnI* und *XhoI*).

Das Gen für YFP war in allen Plasmiden mit dem *CMV-Promotor* fusioniert, die Gene für Bestrophin-1 (WT und Mutanten) jeweils mit dem *EF-1alpha-Promotor*.

Zuletzt erfolgte zur Bestätigung der korrekten Größe der Inserts und somit zur weiteren Feststellung des Erfolgs der Klonierungen ein Kontroll-Verdau aller Plasmide mit BamHI (siehe 3.1.12).

Im Folgenden werden alle Einzelschritte genauer erläutert.

3.1.2 PCR zur Erweiterung von *pcDNA3.1-YFP* um die Schnittstellen von XbaI und Scal

Da das Ausgangsplasmid *pcDNA3.1-YFP* nicht über die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und Scal verfügte, musste es vor dem Verdau zunächst um diese erweitert werden. Hierfür wurde die PCR-Technik unter Verwendung der Primer Sca-YFP-F und YFP-Xba-R angewendet. Das verwendete PCR-Programm und der Reaktionsansatz sind unter *Tab. 7* bzw. *Tab. 8* einsehbar. Die Sequenzen der eingesetzten Primer werden unter *Tab. 4* angegeben.

Tab. 7 Reaktionsansatz PCR Sca-YFP-F/YFP-Xba-R

10 µL	pcDNA3.1-YFP (0,01 µg/µL)
0,5 µL	dNTP
5 µL	10x Puffer für PfuUltra II
1 µL	PfuUltra II Fusion Hotstart DNA Polymerase
1 µL	Sca-YFP-F (10 pmol/µmol)
1 µL	YFP-Xba-R (10 pmol/µmol)
31,5 µL	Aqua dest.

Tab. 8 PCR-Programm Pfu-Polymerase

Phase	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1x	94°C	5 min
Denaturierung	35x	94°C	30 sec
Annealing		60°C	30 sec
Elongation		72°C	1 min
Finale Elongation	1x	72°C	3 min
Final Hold	1x	4°C	---

Im Anschluss erfolgte das komplette Auftragen des Ansatzes zusammen mit je 5 μL Gelladepuffer auf 1%-iges Agarose-Gel (in TBE mit 10 μL Ethidiumbromid). Nach Elektrophorese (60 min, 100 V) wurde die gewünschte Bande (Quick-Load 2-Log DNA Ladder diente der Größenbestimmung) mit einem Skalpell unter Beleuchtung mit UV-Licht ausgeschnitten. Die Reinigung des PCR-Produktes wurde wie unter 3.1.4 beschrieben durchgeführt.

3.1.3 Plasmidverdau und Restriktionsenzyme

Alle Ausgangsplasmide sowie der um die Schnittstellen von *Scal* und *XbaI* erweiterte und gereinigte Pfu-PCR-Ansatz von *pcDNA3.1-YFP* wurden mit den unter *Tab. 10* aufgeführten Restriktionsenzymen im unter *Tab. 9* angegebenen Reaktionsansatz für 2 Stunden bei 37°C verdaut. *Tab. 10* zeigt die verwendeten Restriktionsenzyme mit den zugehörigen Schnittstellen und Puffern.

Tab. 9 Reaktionsansatz Restriktionsverdau

4 μL	Ausgangsplasmid (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
0,5 μL	100x BSA
5 μL	10x NEB-Puffer
1 μL	Restriktionsenzym 1
1 μL	Restriktionsenzym 2
38,5 μL	Aqua dest.

Tab. 10 Verwendete Restriktionsenzyme mit zugehörigen Schnittstellen, Puffern und den gewünschten Bandengrößen in der Gel-Elektrophorese

Restriktionsenzyme mit Schnittstellen	Ausgangsplasmid	Größe der gewünschten Bande	Puffer
Scal 5'...AGT'ACT...3'	pBudCE4.1	4591 bp	NEB2
XbaI 5'...T'CT AGA...3'	Pfu-PCR-Ansatz von pcDNA3.1-YFP	724 bp	
XhoI 5'...C'TC GAG...3'	pBudCE4.1-YFP	5206 bp	NEB4
PmeI 5'...GTTT'AAAC...3'	pcDNA3.1-hbest1WT	1786 bp	
KpnI 5'...GGTAC'C...3'	pBudCE4.1-YFP	5302 bp	NEB1
XhoI 5'...C'TC GAG...3'	pcDNA3-hbest1T6P (-R218C, -F305S)	1910 bp	

Wie unter 3.1.2 beschrieben, wurden die Ansätze jeweils komplett auf 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese die jeweils gewünschten Banden (*siehe Tab. 10*) unter Beleuchtung mit UV-Licht ausgeschnitten (*Abb. 9*).

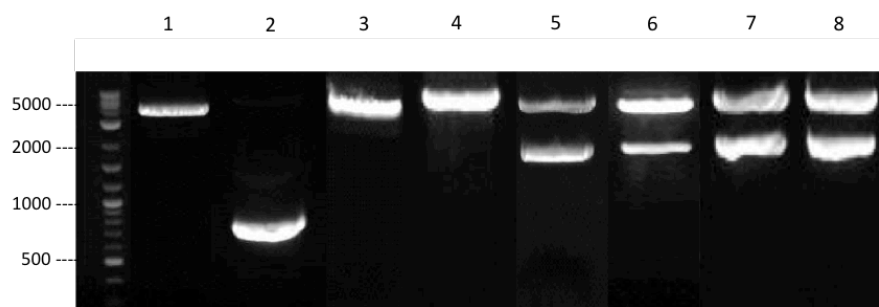


Abb. 9 Plasmidverdaue nach Gelelektrophorese

1: pBudCE4.1, 2: Pfu-PCR-Ansatz von pcDNA3.1-YFP, 3: pBudCE4.1-YFP (XhoI/PmeI), 4: pBudCE4.1-YFP (KpnI/XhoI), 5: pcDNA3.1-hbest1WT, 6: pcDNA3-hbest1T6P, 7: pcDNA3-hbest1R218C, 8: pcDNA3-hbest1F305S

3.1.4 Gelextraktion

Zur Gelextraktion wurden das Set „NucleoSpin Extract II“ (Machery-Nagel) und das darin enthaltene Protokoll verwendet. Das jeweils ausgeschnittene Gelstück wurde in NT-Binde-Puffer (200 µL/100 mg Gel) für 10-15 min bei 50°C lysiert und die DNA unter Zentrifugation (1 min, 11000 g) in einer Säule gebunden. Nach einem Waschschrift mit 600 µL NT3-Wasch-Puffer (Zentrifugation für 1 min bei 11000 g) und einem Trocknungsschritt (Zentrifugation für 2 min bei 11000 g) wurde die DNA nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in 20 µL Aqua dest. eluiert (Zentrifugation für 1 min bei 11000 g).

3.1.5 Ligation

Bei der Herstellung des Ligationsansatzes wurde ein etwa dreifacher molarer Überschuss der Insert-DNA gegenüber der Vektor-DNA angestrebt. Der unter *Tab. 11* angegebene Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Tab. 11 Reaktionsansatz Ligation

1 µL	Vektor (50 ng/µL)
3 µL	Insert (50 ng/µL)
1 µL	10x Puffer für T4 DNA-Ligase
1 µL	T4 DNA Ligase
4 µL	Aqua dest.

3.1.6 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente *Escherichia coli*-Bakterien („XL1-Blue“) gewählt. 100 µL „XL1-Blue“ wurden mit 1,7 µL beta-Mercaptoethanol 10 min lang auf Eis belassen. Nach Zugabe der DNA (halber Ligationsansatz) folgte eine Inkubation auf Eis für weitere 30 min. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 sec wurde der Bakterien-Ligationsansatz für weitere 2 min auf Eis belassen. 1 mL von auf 42°C vorgewärmtem SOC-Medium wurde hinzugegeben und die Bakterien unter Schütteln (160 rpm) 1 h lang bei 37°C inkubiert. Nach Ausplattieren von 100 µL bzw. 300 µL auf LB-Platten mit Zeocin wurden diese über Nacht bei 37°C belassen.

Als Negativkontrolle diente eine Transformation von „XL1-Blue“ mit verdautem Vektor bei ansonsten identischem Prozedere.

3.1.7 Plasmid-Kontrolle durch PCR nach Vermehrung in *Escherichia coli* („Kolonie-PCR“)

Es wurden im Anschluss an die Transformation pro Plasmid 10 Bakterien-Kolonien gewählt und aufgenommen, diese jeweils in 6 μL LB-Medium mit Zeocin resuspendiert und davon je 3 μL für den PCR-Reaktionsansatz verwendet (siehe Tab. 12 und Tab. 13, die Sequenzen der eingesetzten Primer werden unter Tab. 4 angegeben). Die restlichen 3 μL der Suspension wurden zum Ansetzen der Vorkulturen für die „Mini-preps“ (siehe 3.1.8) genutzt. Außerdem wurde im gleichen Schritt von jeder ausgewählten Kolonie je eine sogenannte Sicherungsplatte für die schlussendlich folgenden „Midi-preps“ (siehe 3.1.10) beimpft.

Tab. 12 Reaktionsansatz „Kolonie-PCR“

Für pBudCE4.1-YFP

3 μL	DNA
0,5 μL	dNTP
5 μL	5x Puffer Green GoTaq
0,2 μL	GoTaq DNA Polymerase
1 μL	T7-F
1 μL	YFP-Xba-R
14,3 μL	Aqua dest.

Für pBudCE4.1-YFP-hbest1WT (-T6P, -R218C, -F305S)

3 μL	DNA
0,5 μL	dNTP
5 μL	5x Puffer Green GoTaq
0,2 μL	GoTaq DNA Polymerase
1 μL	hVMD2-369-F
1 μL	BGH-R
14,3 μL	Aqua dest.

Anmerkung zu Tab. 12: Die DNA lag in Form einer Bakterien-Suspension in LB-Medium mit Zeocin vor. Alle Primer lagen in einer Konzentration von 10 pmol/ μL vor. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit 3 μL Aqua dest. anstelle von DNA hergestellt.

Tab. 13 PCR-Programm "Kolonie-PCR"

Phase	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1x	94°C	5 min
Denaturierung	33x	94°C	30 sec
Annealing		56°C	30 sec
Elongation		72°C	1 min
Finale Elongation	1x	72°C	3 min
Final Hold	1x	4°C	---

Anschließend erfolgte das Auftragen auf 1%-iges Agarose-Gel (in TBE, mit 10 µL Ethidiumbromid). Nach Elektrophorese (30 min, 100 V) wurden die zu erwartenden Banden unter UV-Beleuchtung kontrolliert (Quick-Load 2-Log DNA Ladder diente der Größenbestimmung).

3.1.8 „Mini-preps“

Nach einer Vorinkubation von je 3 µL Bakteriensuspension (*siehe 3.1.7*) in je 2 mL LB-Medium mit Zeocin bei 37°C (Inkubationsschüttler) über Nacht erfolgten die sogenannten „Mini-preps“ der ausgewählten Kolonien, also das Isolieren der enthaltenen Plasmide mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche) und des darin enthaltenen Protokolls.

Der Medium-Überstand wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 11000 g entfernt und die Bakterienpellets in je 250 µL P1-Suspensionspuffer resuspendiert. Je 250 µL P2-Lysepuffer wurden hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Inkubation auf Eis mit je 350 µL P3-Bindepuffer folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 g). Der Überstand, welcher die Plasmide enthielt, wurde in einer Säule erneut zentrifugiert (13000 g für 1 min), wodurch die Plasmide gebunden wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, 13000 g) mit je 700 µL P5-Waschpuffer und einem Trocknungsschritt (1 min, 13000 g) wurden die Plasmide mit je 40 µL Aqua dest. für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (1 min, 13000 g) eluiert.

Nach der DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop 1000-Spektrophotometer wurden alle Plasmide mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 1 µg/µL verdünnt.

3.1.9 Sequenzierung

Mit dem Sequenzieren der in den „Mini-preps“ isolierten Plasmide nach Sanger wurde die Firma Entelechon GmbH in Bad Abbach beauftragt. Pro Primer-Plasmid-Kombination wurden folgende Reaktionsgemische an die Firma gesendet:

Tab. 14 Ansatz für die Sequenzierung

2 µL	Plasmid (1 µg/µL)
1 µL	Primer
7 µL	Aqua dest.

Alle Primer lagen in einer Konzentration von 10 pmol/µL vor. Die pro Plasmid verwendeten Primer und deren Sequenzen können in *Tab. 15* bzw. *Tab. 4* eingesehen werden.

Tab. 15 Verwendete Primer für die Sequenzierung

Plasmid	Primer
pBudCE4.1-YFP	T7-F pBud-R GFP-R
pBudCE4.1-YFP-hbest1WT	EF-1alpha-F hbest1-286-F BGH-R
pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P	EF-1alpha-F BGH-R
pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C	EF-1alpha-F BGH-R
pBudCE4.1-YFP-hbest1F305S	EF-1alpha-F hVMD2-496-F BGH-R

3.1.10 „Midi-preps“

Nach dem Sequenzieren wurde pro Plasmid eine Kolonie für die „Midi-preps“ ausgewählt.

Zunächst wurden, dem Vorgehen bei den „Mini-preps“ entsprechend, Vorkulturen angesetzt: Die ausgewählten Kolonien wurden von den Sicherungs-Platten (*siehe 3.1.7*) aufgenommen, damit wurden 4 mL LB-Medium (mit Zeocin) beimpft und bei 37°C für 8 h inkubiert (Inkubationsschüttler). Der Suspension wurden weitere 100 mL LB-Medium (mit Zeocin) zugegeben und über Nacht bei 37°C auf dem Inkubationsschüttler inkubiert („Übernacht-Kulturen“).

Die „Midi-preps“ wurden mit Hilfe des „Qiagen Plasmid Midi Kit“ und des darin enthaltenen Protokolls durchgeführt.

Nach Entfernen des Mediums durch Zentrifugation (15 min, 5500 g, 4°C) wurden die Bakterienpellets in je 4 mL P1-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 4 mL P2-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 4 mL P3-Lysepuffer auf Eis für 15 min lysiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte (45-60 min, 5500g, 4°C) und der Überstand wurde durch Filterpapier gefiltert. Eine Säule aus dem Kit wurde mit je 4 mL QBT-Bindepuffer equilibriert. Anschließend wurde diese mit dem gefilterten Lysat beladen und zweimal mit je 10 mL QC-Waschpuffer gewaschen. Zum Lösen der Plasmide von der Säule wurden je 5 mL QF-Elutionspuffer verwendet. Mit je 3,5 mL Isopropanol wurde die DNA zum Präzipitieren gebracht, das Pellet nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, 5500 g, 4°C) mit je 2 mL 70%-igem Ethanol gewaschen und nach weiterem Zentrifugieren (10 min, 5500 g) der Überstand entfernt. Die Pellets wurden für 10 min luftgetrocknet und schließlich mit je 150 µL Aqua dest. resuspendiert.

Nach der DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop 1000-Spektrophotometer wurden alle Plasmide mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 1 µg/µL verdünnt.

3.1.11 Glycerin-Kulturen

Zum Konservieren der jeweils für die „Midi-preps“ gewählten Kolonien wurden je 800 µL der „Übernacht-Kulturen“ (*siehe 3.1.10*) mit je 150 µL 80%-igem Glycerin gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

3.1.12 Kontrollverdau

Abschließend erfolgte zur Bestätigung der korrekten Größe der Plasmid-Inserts und somit zur weiteren Feststellung des Erfolgs der Klonierungen ein Kontroll-Verdau aller Plasmide mit BamHI für 18 h bei 37°C (*Reaktionsansatz siehe Tab. 16*). *Tab. 17 fasst die zu erwartenden Größen der Plasmid-Stücke zusammen.*

Tab. 16 Reaktionsansatz Restriktionsverdau BamHI

1 µL	Plasmid-DNA (1 µg/µL)
0,5 µL	100x BSA
5 µL	10x NEB3-Puffer
1 µL	BamHI
42,5 µL	Aqua dest.

Tab. 17 BamHI-Schnittstelle und die zu erwartenden Banden in der Gel-Elektrophorese

Schnittstelle	Ausgangsplasmide	Zu erwartende Bandengröße
5' G'GATCC 3'	pBudCE4.1-YFP	5315 bp
	pBudCE4.1-YFP-hbest1WT	4103 bp
		2889 bp
	pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P (-R218C, -F305S)	3105 bp
		2375 bp
		1732 bp

Der Ansatz wurde zusammen mit je 5 µL Gelladepuffer auf 1%-iges Agarose-Gel (in TBE, mit 10 µL Ethidiumbromid) aufgetragen. Nach Elektrophorese (60 min, 100 V) erfolgte die Kontrolle der zu erwartenden Banden (*siehe Tab. 17 und Abb. 10*) unter UV-Beleuchtung (Quick-Load 2-Log DNA Ladder diente der Größenbestimmung).

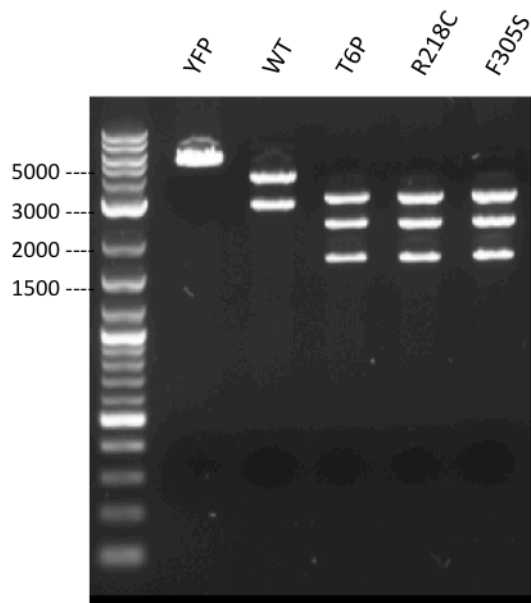


Abb. 10 Kontrollverdau mit BamHI

Es zeigen sich die erwarteten Banden für *pBudCE4.1-YFP* („YFP“: 5315 bp), *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* („WT“: 4103 bp, 2889 bp) und *pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P* bzw. -*R218C* bzw. -*F305S* („T6P“ bzw. „R218C“ bzw. „F305S“: 3105 bp, 2375 bp, 1732 bp).

Wie im Methodenteil einleitend beschrieben war es erforderlich, die klonierten Plasmide vor ihrem Einsatz im Calcium Imaging-Experiment daraufhin zu untersuchen, ob sie tatsächlich beide Proteine, Bestrophin-1 (WT und Mutanten) und YFP, simultan exprimierten. Diesem Zweck dienten der Western Blot und die Immunfluoreszenzmikroskopie (in den Abschnitten 3.4 und 3.5 beschrieben). Hierzu sowie zur Durchführung der Calcium Imaging-Experimente wurden ARPE-19-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert.

3.2 Zellkultur von ARPE-19-Zellen

Die ARPE-19-Zellen (bezogen von LGC Standards/ATCC, CRL-2302) wurden in einem speziellen ARPE-19-Medium (*siehe Tab. 18*) kultiviert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Experimente wurden Zellpassagen von P8 bis P20 verwendet.

Tab. 18 Zusammensetzung Kulturmedium für ARPE-19-Zellen

500 mL	DMEM/Ham's F-12-Medium mit L-Glutamin
55 mL	FBS (fetal bovine serum) (entspricht 10%)
5,5 mL	Penicillin/Streptomycin (x100)
23,3 mL	7,5% Natriumbikarbonat

Zum Splitten der Zellen (etwa alle fünf Tage) unter sterilen Bedingungen wurde folgendes Protokoll angewendet: Waschen mit PBS-EDTA (1 mM) für 30-60 sec, Trypsinieren mit Trypsin-EDTA für 3 min, Abstoppen der Reaktion mit Kulturmedium, Zentrifugieren bei 800 g für 3 min, Resuspendieren mit Kulturmedium. Das erneute Aussäen auf Petrischalen, Kulturflaschen oder 12-Well-Platten erfolgte nach vorherigem Auszählen in der Zählkammer.

Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt.

3.3 Transfektion von ARPE-19-Zellen

Wie bereits erläutert, wurden die ARPE-19-Zellen mit *pBudCE4.1-YFP* bzw. *pBudCE4.1-YFP-hbest1* (*WT* bzw. *Mutanten*) transfiziert.

Bei der Transfektion subkonfluenten Zellen, die für etwa 24 Stunden auf Deckgläsern von 18 mm Durchmesser in 12-Well-Platten angezüchtet worden waren (*siehe 3.2*), wurde folgendes Protokoll angewendet:

Es wurden 2 µL Plasmid (1 µg/µL) und 4 µL Lipofectamin (1 µg/µL) jeweils in 500 µL Opti-MEM I (Angaben gelten pro Well) für 5 min getrennt bei Raumtemperatur belassen, dann nach Zusammenführen beider Lösungen für 20-30 min bei 37°C inkubiert und diese Mischung anschließend zu je 1000 µL pro Well verteilt.

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte der Kulturmediumwechsel auf ARPE-19-Medium.

36 bis 48 Stunden nach Transfektion wurden die Calcium Imaging-Experimente durchgeführt bzw. die Zellen fixiert (Immunfluoreszenzmikroskopie) oder geerntet (Western Blot).

3.4 Western Blot

36 bis 48 Stunden nach Transfektion wurde jeweils eine Zellzahl, die in etwa der Menge von zwölf 12-Well-Platten entsprach, mit einem Zellspachtel geerntet. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die gleiche Menge an untransfizierten Zellen geerntet. Die geernteten Zellen wurden für 5 min bei 1000 g zentrifugiert, nach Verwerfen des Überstands mit je 1 mL kaltem PBS resuspendiert, erneut 5 min lang bei 3000 g und 4°C zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands mit je 7,5 µL des Proteinaseinhibitor-Cocktails „Roche complete mini“ und je 75 µL kaltem PBS resuspendiert.

Es folgte die Messung der Protein-Konzentration mittels NanoDrop 1000-Spektrophotometer. Dabei ergaben sich Konzentrationen zwischen 1,49 mg/mL und 3,79 mg/mL.

Nach Zugabe von je 1 µL beta-Mercaptoethanol und je 15 µL 6x SDS-Ladepuffer wurden die Proteinextrakte zum Zerstören von vorhandener DNA einer Behandlung mit Ultraschall unterzogen (zweimal 10 sec mit einer Intensität von 10-20%). Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3 min bei 90°C.

Nach dem Auftragen von je 25 µL der Proteinextrakte auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel in SDS-Laufpuffer wurden die Proteine in einem Spannungsfeld der Größe nach aufgetrennt (80 min, 20 mA). Zum Ablesen der Proteingröße wurde der Protein-Marker IV peqGOLD aufgetragen.

Das Blotting auf die Amersham Hybond-P Membran erfolgte in einem Spannungsfeld von 115 mA für 150 min in Transferpuffer.

Die Membranen wurden für 60 min mit 5%-iger Magermilch (5 g Magermilchpulver in PBS-Tween) zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen behandelt, dann wurde der primäre Antikörper jeweils in PBS-Tween in einer Verdünnung von 1:3000 (anti-Bestrophin) bzw. 1:2000 (anti-GFP) bzw. 1:5000 (anti-beta-Actin) zugegeben und über Nacht bei 4°C belassen.

Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit PBS-Tween wurden die Membranen 60 min lang mit dem sekundären Antikörper anti-mouse HRP (1:5000 in 5%-iger Magermilch) inkubiert.

Die verwendeten Antikörper sind in *Tab. 5* übersichtlich dargestellt.

Nach drei Waschschritten zu je 10 min mit PBS-Tween wurden die Membranen in Entwicklerlösung gelegt und das entstehende Chemilumineszenzsignal im Geldokumentationssystem erfasst (während einer 15-minütigen Belichtungszeit).

Alle Arbeitsschritte an der Blotting-Membran wurden mit Ausnahme der letzten drei Waschschritte auf dem Vortex-Shaker durchgeführt.

3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die auf 18 mm-Deckgläsern gezüchteten Zellen wurden etwa 36 bis 48 Stunden nach Transfektion (*siehe 3.3*) nach kurzem Waschen mit PBS in 4%-igem Paraformaldehyd für 10-15 min bei Raumtemperatur fixiert.

Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für je 10 min mit anschließendem 40- bis 60-minütigem Inkubieren in Blockierlösung (*Zusammensetzung siehe Tab. 19*).

Tab. 19 Zusammensetzung der Blockier- und Antikörperlösung

	Blockierlösung	Antikörperlösung
Triton 5% (x100)	1 mL	0,2 mL
Ziegenserum	1 mL	0,2 mL
10x PBS (pH 7,4)	1 mL	1 mL
Aqua dest.	7 mL	8,6 mL

Im Anschluss wurden die Deckgläser mit dem primären Antikörper anti-Bestrophin (1:500 in Antikörperlösung; *Zusammensetzung siehe Tab. 19*) über Nacht bei 4°C behandelt. Auf drei Waschschriffe zu je 10 min mit PBS-Tween (500 µL/L Tween 20 in PBS) folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers sowie die Färbung der Zellkerne mit dem anti-dsDNA-Antikörper „Hoechst 33342“ (1:500 bzw. 1:1000 in Antikörperlösung) für ca. 60 min.

Tab. 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween für je 10 min wurden die Deckgläser mit dem Eindeckmedium Dako auf Objektträger aufgebracht.

Mit Ausnahme der Behandlung mit dem primären Antikörper wurden alle Schritte bei Raumtemperatur ausgeführt.

Als Negativkontrolle dienten Färbungen, bei denen der sekundäre Antikörper allein (ohne vorherige Behandlung mit primärem Antikörper) aufgetragen wurde. Hiermit sollte die Spezifität des sekundären Antikörpers bestätigt werden. Zusätzlich wurde die Spezifität des primären Antikörpers getestet, indem Zellen, die mit *pBudCE4.1-YFP* transfiziert worden waren, gegen Bestrophin-1 gefärbt wurden.

Die Betrachtung der Fluoreszenz-Färbung erfolgte am Zeiss Axio Observer.Z1 mit dem Imaging System VisiGRID von Visitron, die Visualisierung mithilfe der VisiVIEW Imaging Software. Die verwendeten Exzitations-Wellenlängen lagen bei 488 nm für YFP und 546 nm für Cy3/Bestrophin-1. Es wurde eine 40-fache Vergrößerung gewählt.

Die Bildbearbeitung erfolgte mit ImageJ (Version 1.47b für Mac OS).

3.6 Calcium Imaging

3.6.1 Grundlagen des Calcium Imaging-Experiments

Mit Hilfe des Calcium Imaging können intrazelluläre Calcium-Konzentrationen und deren Änderungen in Abhängigkeit von angewendeten Manövern und eingesetzten Kanalblockern visualisiert und gemessen bzw. errechnet werden. Ziel dieser Arbeit war es, wie bereits beschrieben, den speicherabhängigen Einstrom von Calcium (SOCE) in ARPE-19-Zellen und die Beteiligung von LTCC am SOCE zu beurteilen. Dabei sollte näher untersucht werden, welche Rolle Bestrophin-1 und die entsprechenden Mutanten in diesem Zusammenhang spielen.

Die Calcium Imaging-Experimente wurden an ARPE-19-Zellen 36 bis 48 Stunden nach Transfektion (*siehe 3.3*) mit *pBudCE4.1-YFP* bzw. *pBudCE4.1-YFP-hbest1* (WT bzw. Mutanten) durchgeführt.

Die Zellen wurden mit Ringer-Lösung (*Zusammensetzung siehe Tab. 20*) gewaschen und für 40 min mit 2 μ L Fura-2-AM (1 μ g/ μ L; Endkonzentration: 4 μ M) und 2 μ L Pluronic (Endkonzentration: 0,03 μ M bzw. 0,04% w/v) in 500 μ L Opti-MEM I bei 37°C inkubiert.

Tab. 20 Zusammensetzung Ringer-Lösung

145 mM	NaCl
0,4 mM	KH ₂ PO ₄
1,6 mM	K ₂ HPO ₄
5 mM	Glucose
1 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
1,3 mM	Ca-Gluconat x 1 H ₂ O

pH-Einstellung auf einen Wert von 7,4 mit NaOH bzw. HCl

Anschließend wurden die Zellen erneut mit Ringer-Lösung gewaschen und für etwa 20 min bei Raumtemperatur belassen.

Zur Durchführung der Calcium Imaging-Experimente wurde das Deckglas mit Silikon-Paste an einer Perfusionskammer fixiert, die Kammer auf ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop

aufgesetzt und kontinuierlich in einem Perfusions-Pump-System mit 37°C-warmen Lösungen perfundiert.

Die Zellen wurden in einem ersten Schritt mit Ringer-Lösung perfundiert, bis sich die intrazellulären Calcium-Werte auf ein stabiles Basal-Level einstellten.

Zur passiven Leerung intrazellulärer Calcium-Speicher wurden die Zellen ca. 2 min mit Thapsigargin (Endkonzentration 1 μ M in Ringer-Lösung), einem irreversiblen Inhibitor der ATPase SERCA (*sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPase*), behandelt. Es konnte ein erster Anstieg der Calcium-Konzentration beobachtet werden.

Zur Aktivierung des SOCE wurde wie folgt vorgegangen:

Durch Perfusion mit einer Calcium-freien Lösung (*Zusammensetzung siehe Tab. 21*) wurde den Zellen passiv Calcium aus dem Intrazellulärraum entzogen. Nach 2 min erfolgte die Umstellung auf Ringer-Lösung. Es konnte nach etwa 60 sec ein stark erhöhter Calcium-Anstieg beobachtet werden, welcher weit über das Basal-Level hinausging und dem SOCE entsprach.

Tab. 21 Zusammensetzung Calcium-freie Lösung

125 mM	NaCl
0,4 mM	KH ₂ PO ₄
1,6 mM	K ₂ HPO ₄
5 mM	Glucose
1 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
45 mM	EGTA

pH Einstellung auf einen Wert von 7,4 mit NaOH bzw. HCl

Da neben dem Ausmaß des SOCE auch eine Abnahme desselben durch den Einsatz eines LTCC-Blockers beurteilt werden sollte, mussten etwaige natürliche Schwankungen des SOCE zwischen verschiedenen Einzelerperimenten ausgeschaltet werden. Daher wurde ein sogenanntes „Doppel-Paradigma“ eingesetzt, also ein zweimaliges Auslösen des SOCE direkt hintereinander in derselben Zellgruppe, zunächst ohne und dann mit Einsatz eines LTCC-Inhibitors.

Nachdem die Zellen nach dem ersten Auslösen des SOCE (SOCE1) in ein stabiles Calcium-Level zurückkehrten, wurden sie erneut mit Calcium-freier Lösung für 2 min perfundiert, gefolgt von Ringer-Lösung. Dies führte nach etwa 60 sec zu einem zweiten SOCE (SOCE 2). Bei den Kontroll-Experimenten wurde beide Male Ringer-Lösung verwendet, bei den Experimenten mit Blockierung von LTCC wurde nur beim ersten Provozieren des SOCE1 Ringer-Lösung verwendet, beim Provozieren des SOCE2 Ringer-Lösung angereichert mit dem LTCC-Blocker (R)-(+)-Bay K 8644 (Endkonzentration 10 μ M).

Durch dieses Manöver (Doppel-Paradigma) konnte SOCE2 unter Kanalblockade direkt mit SOCE1 ohne Blockade innerhalb derselben Zellen verglichen werden.

Zur Kalibrierung, welche für die Berechnung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen notwendig war, wurden die Zellen am Ende des Experiments erst mit Calcium-freier (+ EGTA) und dann mit stark Calcium-gesättigter Ringer-Lösung (3,3 mM CaCl_2) – jeweils angereichert mit 5 μ M des Ionophors Ionomycin – perfundiert.

Abb. 11 veranschaulicht die Abfolge der eingesetzten Lösungen.

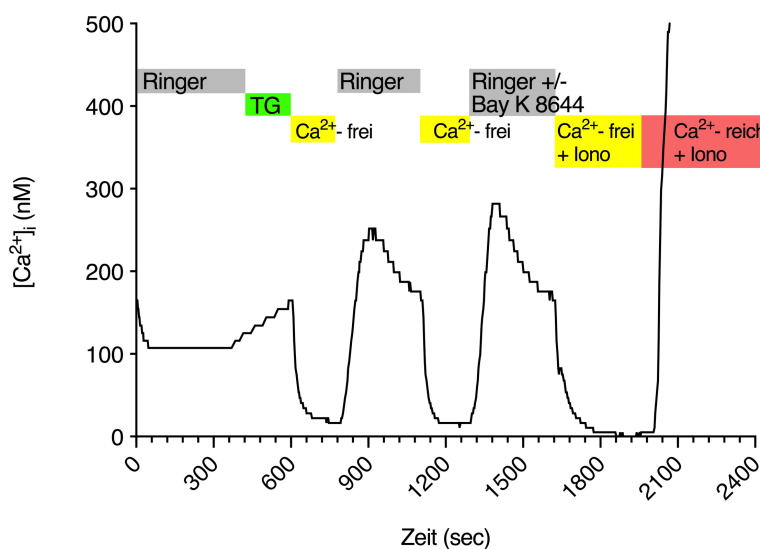


Abb. 11 Abfolge der eingesetzten Lösungen im Calcium Imaging-Experiment

Nach initialer Perfusion mit Ringer-Lösung zum Erreichen eines stabilen Basal-Calcium-Niveaus folgte die Inhibierung von SERCA mit Thapsigargin (TG), was zu einem ersten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führte. SOCE wurde zweimalig hintereinander ausgelöst: auf Calcium-freie Lösung folgte jeweils Ringer-Lösung (beim zweiten Mal mit oder ohne den LTCC-Blocker (R)-(+)-Bay K 8644). Die zur Berechnung der Calcium-Konzentrationen notwendige Kalibrierung erfolgte mit Calcium-freier Lösung (mit EGTA und Ionomycin) und Calcium-reicher Lösung (3,3 mM CaCl_2 und Ionomycin).

Um zu erläutern, wie die endgültigen Calcium-Werte berechnet wurden, soll zunächst das Prinzip des Calcium Imaging erklärt werden:

Fura-2-AM, die Substanz, mit der die Zellen vor dem Experiment inkubiert werden, ist ein Fettsäure-Ester des Fura-2, der membrangängig ist und nach Aufnahme durch die Zellmembran von intrazellulären Esterasen gespalten wird. Das entstehende Produkt Fura-2 ist nicht mehr zellmembran-permeabel und wird in der Zelle angereichert. Es bindet als Calcium-Chelator sehr selektiv Calcium und kann von Licht im UV-Bereich dazu angeregt werden, selbst Licht zu emittieren, also zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz-Intensität (gemessen bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm) ist dabei zum einen abhängig von der aktuellen intrazellulären Calcium-Konzentration der beobachteten Zelle und zum anderen von der Wellenlänge des exzitierenden Lichts (151). Diese Abhängigkeit wird in *Abb. 12* dargestellt.

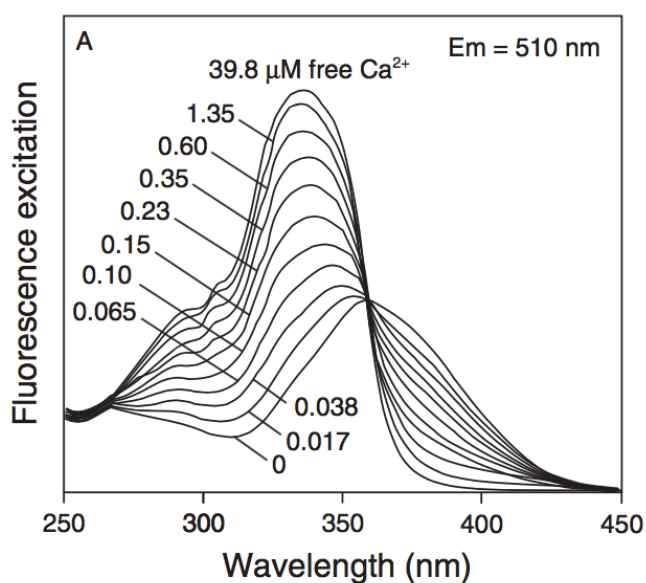


Abb. 12 Fluoreszenz-Exzitationsspektrum von Fura-2

Dargestellt wird die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Exzitationswellenlänge sowie von der intrazellulären Calcium-Konzentration (E_m = Emissionswellenlänge).

(Abbildung angelehnt an Grynkiewicz G *et al.* (151))

Die Fluoreszenz-Intensitäten bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 380 nm werden im Folgenden mit W1 bzw. W2 bezeichnet. Das anregende Licht wurde mithilfe des „VisiChrome High speed Polychromator Systems“ in Abständen von 3 sec mit 340 nm bzw. 380 nm kurz hintereinander (0,5-sec-Intervall) erzeugt, W1 und W2 jeweils von einer Kamera detektiert, die Daten an einen Computer weitergeleitet und dann ins Verhältnis zueinander gesetzt und mit Graphen visualisiert (Software Metafluor): Der so ermittelte Quotient W1/W2 wird im Folgenden mit R („Ratio“) bezeichnet (*siehe Abb. 13 (A),(B)*).

Um von der zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessenen Ratio R auf die entsprechende tatsächliche intrazelluläre Calcium-Konzentration schließen zu können (*siehe Abb. 13 (C)*), muss wie weiter oben beschrieben eine Kalibrierung durchgeführt werden, bei der die minimale sowie die maximale Sättigung von Fura-2 ermittelt werden.

Aus den Daten von W2_f (W2 unter Calcium-freien Bedingungen), W2_b (W2 unter stark Calcium-gesättigten Bedingungen) und Ratio R können über folgende Formel nach Grynkiewicz die tatsächlichen intrazellulären Calcium-Konzentrationen [Ca²⁺]_i berechnet werden (151):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \cdot W2_f / W2_b$$

Mit K_d wird die Dissoziations-Konstante von Fura-2 bezeichnet.

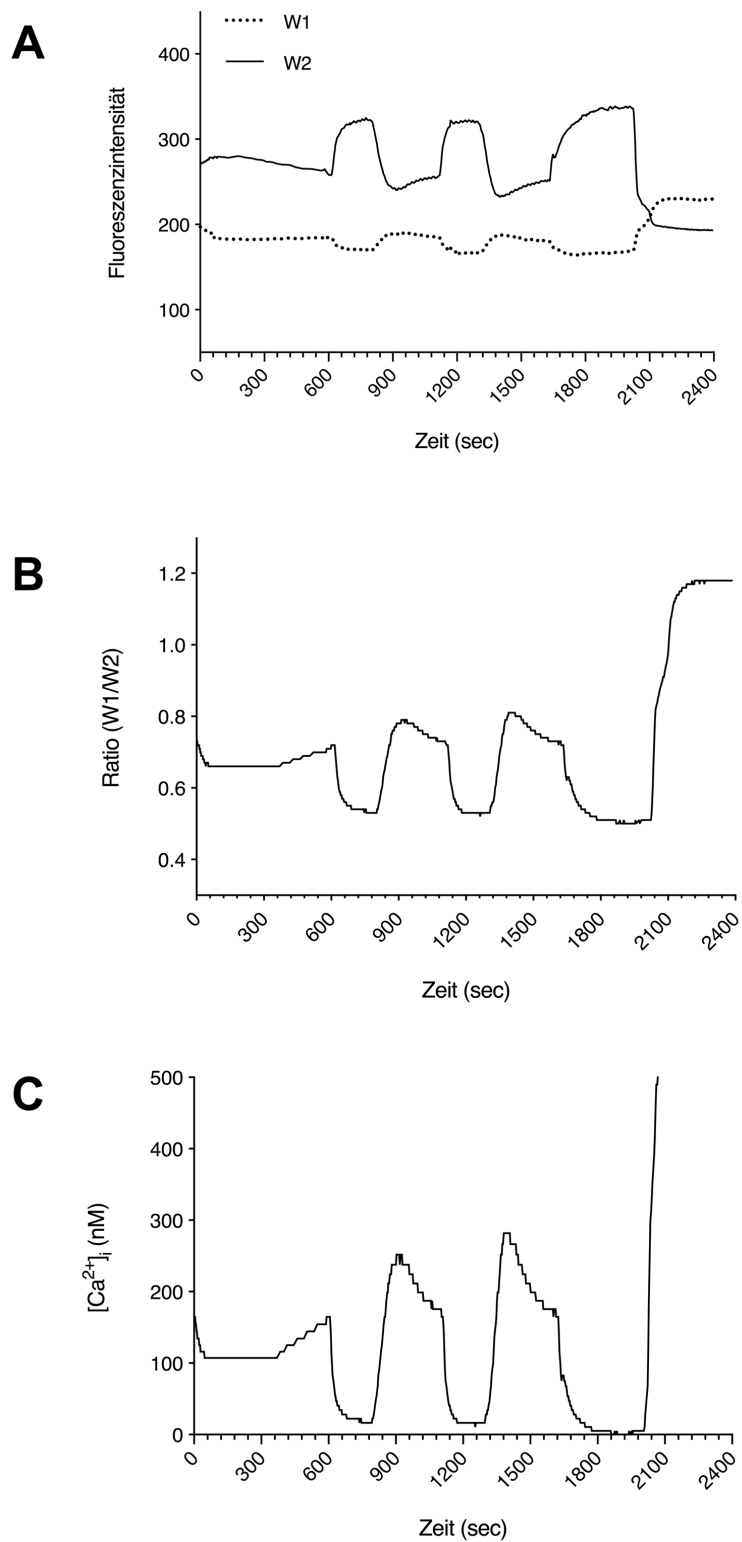


Abb. 13 Fluoreszenzintensitäten, Ratios und Calcium-Konzentrationen im Calcium Imaging-Experiment

Die Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm (W1) bzw. mit 380 nm (W2) werden detektiert (A) und ins Verhältnis zueinander gesetzt: W1 /W2. Dieser Quotient wird als Ratio R bezeichnet (B). Über die Grynkiewicz-Formel lassen sich die tatsächlichen Calcium-Konzentrationen errechnen (C).

Mit SOCE1 bzw. SOCE2 wird $[Ca^{2+}]_{SOCE1}$ bzw. $[Ca^{2+}]_{SOCE2}$, also die Differenz der intrazellulären Calcium-Konzentrationen zwischen dem maximalen Ausschlag während des SOCE und dem Calcium-Basal-Level bezeichnet.

Die im Ergebnisteil jeweils in Prozent angegebene Abnahme von SOCE2 im Vergleich zu SOCE1 wurde folgendermaßen berechnet:

$$\left([Ca^{2+}]_{SOCE1} - [Ca^{2+}]_{SOCE2} \right) / [Ca^{2+}]_{SOCE1}$$

Zur Veranschaulichung dient *Abb. 14*.

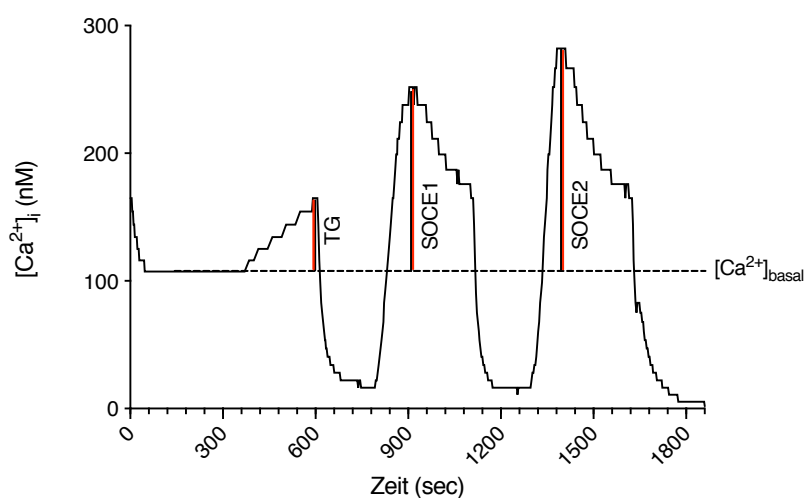


Abb. 14 Graphische Darstellung von $[Ca^{2+}]_{SOCE1}$ und $[Ca^{2+}]_{SOCE2}$

Mit $[Ca^{2+}]_{SOCE1}$ bzw. $[Ca^{2+}]_{SOCE2}$ wird die Differenz zwischen dem maximalen Ausschlag des ersten bzw. zweiten SOCE und dem basalen Calcium-Level $[Ca^{2+}]_{basal}$ bezeichnet. Die Differenz dieser beiden Werte wird ins Verhältnis zu $[Ca^{2+}]_{SOCE1}$ gesetzt und dies mit „Abnahme um x%“ beschrieben.

Jedes Experiment wurde (mit Ausnahme der unter 4.3.1 beschriebenen Kontroll-Experimente) zeitgleich an transfizierten und untransfizierten ARPE-19-Zellen durchgeführt, da die Transfektionsrate bei etwa 20-30% lag. Somit dienten in jedem Experiment die jeweils untransfizierten Zellen als direkte Kontrollen.

Die Unterscheidung zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen erfolgte vor Beginn des eigentlichen Calcium Imaging-Experiments durch Beleuchtung der Zellen mit Licht der Wellenlänge 514 nm (= Exzitationswellenlänge von YFP) (*siehe Abb. 15*). Ausschließlich in transfizierten Zellen waren YFP und folglich auch Bestrophin-1 (WT oder Mutanten) vorhanden (*siehe 4.1*).

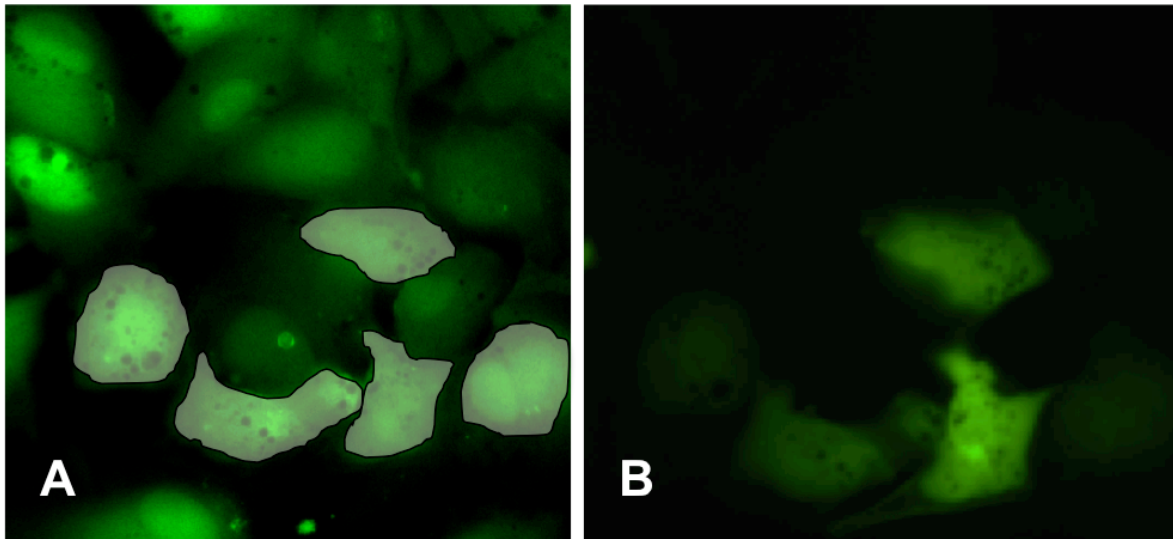


Abb. 15 Zellen im Calcium Imaging-Experiment

(A) zeigt alle Zellen eines Experiments, welche Fura-2 enthalten. (B) Durch Exzitation von YFP leuchten nur diejenigen Zellen auf, die YFP und folglich auch Bestrophin-1 (WT bzw. Mutanten) enthalten. Transfizierte Zellen wurden in (A) hervorgehoben.

3.6.2 Statistische Auswertung der Calcium Imaging-Experimente

Calcium-Konzentrationen, Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) wurden in „Microsoft Excel“ berechnet.

Die Durchführung des parametrischen t-Tests nach Student zur Feststellung von Signifikanzen bei unabhängigen Stichproben erfolgte in „GraphPad Prism 6“.

Der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben und der parametrische t-Test für abhängige Stichproben bzw. der nicht-parametrische Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon für abhängige Stichproben wurden in „GraphPad Prism 8“ zur Signifikanztestung verwendet. Die Prüfung auf Normalverteilung (parametrisch vs. nicht-parametrisch) erfolgte dabei mittels Shapiro-Wilk-Test.

Die Signifikanzgrenze lag bei $p = 0,05$ (Darstellung in den Diagrammen: $p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: **, $p \leq 0,001$: ***).

Jedes Calcium Imaging-Experiment wurde mindestens dreimal ausgeführt, für die Berechnungen standen Daten von jeweils mindestens $n=12$ Zellen zur Verfügung (Ausnahme: Experiment „F305S“, $n=7$).

Die Ergebnisse werden im Ergebnisteil als Mittelwert \pm SEM präsentiert.

Für die Anfertigung von Graphen und Diagrammen wurde „GraphPad Prism 6“ verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von Bestrophin-1 (Wildtyp und Mutanten) und YFP in ARPE-19-Zellen mittels Western Blot

Mittels Western Blot wurde geprüft, ob nach Transfektion der ARPE-19-Zellen die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Plasmide die gewünschten Proteine exprimierten und ob sich in mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1* (WT und Mutanten) transfizierten Zellen beide Proteinbanden (für YFP und für Bestrophin-1) deutlich nachweisen ließen.

Die Färbung des ubiquitär vorkommenden zytoskeletalen „house-keeping“ (konstitutiv auf hohem Level exprimierten) Proteins β -Actin diente dabei als Positivkontrolle. Zellen, die keiner Transfektion unterzogen worden waren, dienten als Negativkontrolle.

β -Actin konnte in jeder Zellgruppe deutlich dargestellt werden (erfolgreiche Positivkontrolle). In den mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten Zellen zeigte sich eine Proteinbande für YFP, jedoch keine Bande für Bestrophin-1. In den mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1* (WT und Mutanten) transfizierten Zellen konnte sowohl YFP als auch Bestrophin-1 nachgewiesen werden. Die untransfizierten ARPE-19-Zellen zeigten lediglich eine Präsenz von β -Actin in Abwesenheit von YFP oder Bestrophin-1 (erfolgreiche Negativkontrolle) (siehe Abb. 16).

In Zellgruppen, bei denen YFP verhältnismäßig schwach zum Vorschein kam, war die Bestrophin-1-Bande dennoch deutlich erkennbar, so dass man von der Präsenz von YFP auf eine sichere Präsenz von Bestrophin-1 schließen darf.

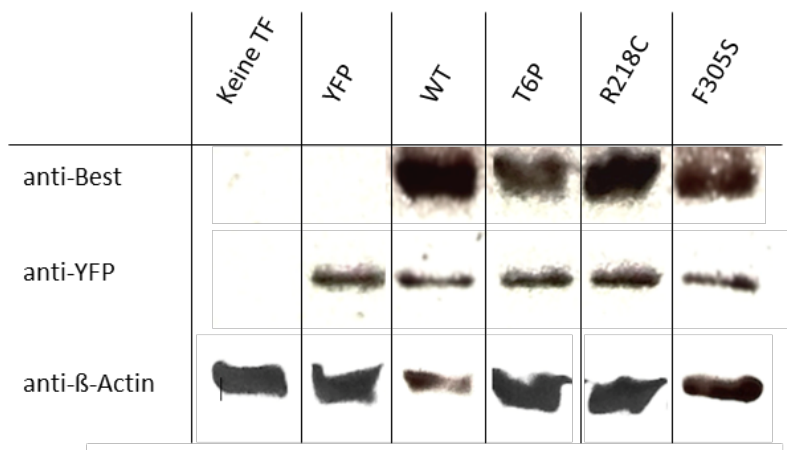


Abb. 16 Western Blot zur Proteindetektion von Bestrophin-1, YFP und β -Actin

Es zeigen sich die erwarteten Banden. „keine TF“ (TF=Transfektion): untransfizierte ARPE-19-Zellen zeigen lediglich ein Vorhandensein des *house-keeping*-Proteins β -Actin. „YFP“: mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierte ARPE-19-Zellen weisen zusätzlich YFP auf. „WT“, „T6P“, „R218C“, „F305S“: nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT*, *-T6P*, *-R218C* bzw. *-F305S* lassen sich sowohl β -Actin als auch YFP und Bestrophin-1 nachweisen.

Anmerkung: Dies ist eine Zusammenstellung mehrerer gesplitteter Western Blots. Die Originalblots können im Anhang eingesehen werden.

4.2 Nachweis der Lokalisation von Bestrophin-1 (Wildtyp und Mutanten) in ARPE-19-Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie diente zum Nachweis, dass in mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1* (WT und Mutanten) transfizierten Zellen Bestrophin-1 und YFP gleichzeitig vorlagen, sowie zur Bestimmung der Lokalisation von Bestrophin-1 (WT und Mutanten).

Zunächst konnte die Spezifität der primären und sekundären Antikörper bestätigt werden. Die Negativkontrollen (sekundärer Antikörper anti-mouse ohne vorherige Behandlung mit primärem Antikörper und anti-Bestrophin-1-Antikörper gegen Zellen, die mit *pBudCE4.1-YFP* transfiziert worden waren) zeigten keine eindeutige Färbung der Zellen (Abbildung wird nicht gezeigt).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass YFP und Bestrophin-1 (WT und Mutanten) innerhalb einer Zelle immer zugleich vorlagen (Beispielzelle siehe Abb. 17). YFP wurde in keiner Zelle ohne die gleichzeitige Präsenz von Bestrophin-1 detektiert und *vice versa*.

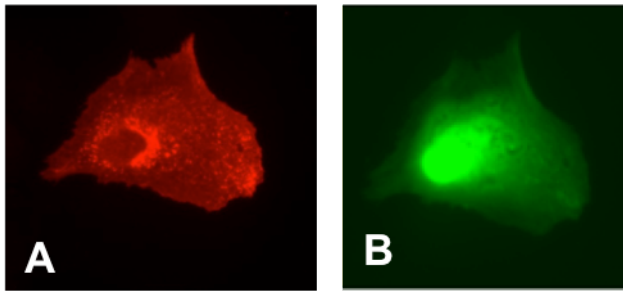


Abb. 17 Lokalisation von Bestrophin-1 und YFP in derselben Zelle am Beispiel einer mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* transfizierten ARPE-19-Zelle
In Rot ist Bestrophin-1 WT dargestellt (A), in Grün YFP (B).

Es wurde in einem weiteren Schritt die Membranständigkeit von Bestrophin-1 WT bzw. Mutanten beurteilt. Lediglich für Bestrophin-1 WT konnte eine anteilige Membranständigkeit vermerkt werden, die mutanten Bestrophine waren ausschließlich im Zytosol lokalisiert (siehe Abb. 18).

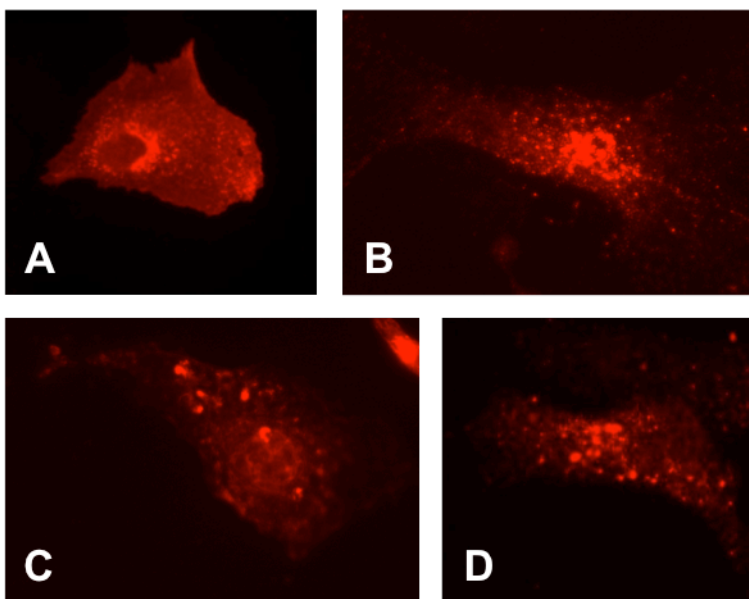


Abb. 18 Beurteilung der Proteinlokalisierung von Bestrophin-1 in ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT, -T6P, -R218C* bzw. *-F305S*
Bestrophin-1 WT (A) zeigt eine anteilige Membranständigkeit, wohingegen die mutanten Bestrophine T6P (B), R218C (C) und F305S (D) im Zytosol lokalisiert sind.

4.3 SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen mit und ohne Bestrophin-1 Wildtyp und Mutanten im Calcium Imaging-Experiment

4.3.1 SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in untransfizierten ARPE-19-Zellen

Zunächst wurde eruiert, in welchem Ausmaß sich LTCC am SOCE in untransfizierten ARPE-19-Zellen beteiligen.

4.3.1.1 SOCE in untransfizierten ARPE-19-Zellen

Wie im Methodenteil (3.6.1) beschrieben, wurde der SOCE pro Experiment in einem Doppel-Paradigma zweimal hintereinander aktiviert. In späteren Durchgängen, bei denen während des zweiten SOCE (SOCE2) Kanalblocker zum Einsatz kamen, sollte SOCE2 im Verhältnis zum ersten SOCE (SOCE1), bei welchem Ringerlösung ohne Inhibitoren verwendet wurde, beurteilt werden (zum Manöver und zur Begrifflichkeit von SOCE1 bzw. SOCE2 siehe 3.6.1). Daher war es notwendig, im Vorhinein SOCE2 ohne den Einsatz von Kanalblockern zu beurteilen, um auszuschließen, dass dieser grundsätzlich verändert und somit nicht mehr vergleichbar war.

Das zweimalige Aktivieren des SOCE in untransfizierten ARPE-19-Zellen erbrachte folgendes Ergebnis: SOCE1 lag bei $169,91 \pm 20,76$ nM, SOCE2 bei $167,97 \pm 14,17$ nM ($n=15$, $p=0,86$; *Abb. 19*). Da sich die Werte für SOCE1 und SOCE2 nur unwesentlich voneinander unterschieden, konnte in den darauf folgenden Experimenten, die den Einsatz von Kanalblockern beinhalteten, SOCE2 im Verhältnis zu SOCE1 direkt beurteilt werden.

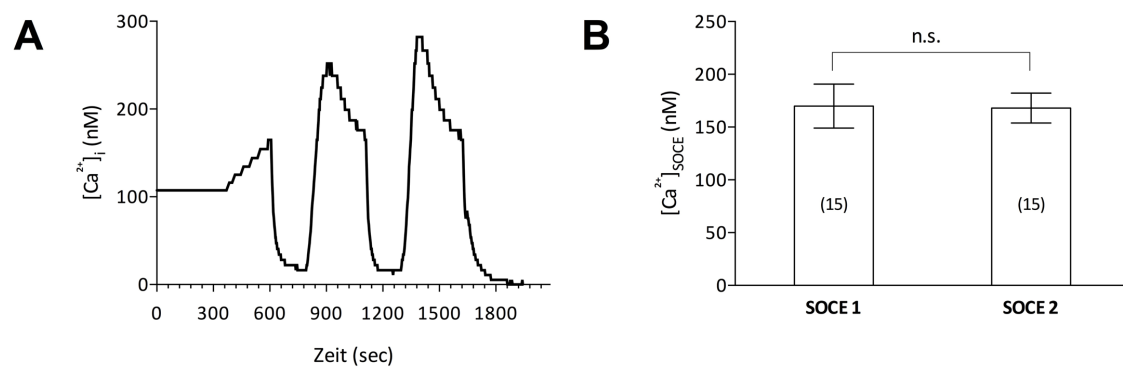


Abb. 19 SOCE im Doppel-Paradigma ohne Kanalblocker in untransfizierten ARPE-19-Zellen

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer untransfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite bzw. dritte Anstieg dem SOCE1 bzw. SOCE2 (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich keinen Unterschied.

4.3.1.2 Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in untransfizierten ARPE-19-Zellen

Um feststellen zu können, in welchem Ausmaß sich LTCC am SOCE in ARPE-19-Zellen beteiligen, wurde der selektive LTCC-Inhibitor (R)-(+)-Bay K 8644 verwendet. Das Doppel-Paradigma wurde wie bereits beschrieben durchgeführt: Beim ersten Aktivieren des SOCE (SOCE1) kam Ringer-Lösung zum Einsatz, beim zweiten Aktivieren von SOCE (SOCE2) 10 μ M (R)-(+)-Bay K 8644 (in Ringer-Lösung). SOCE2 ($85,21 \pm 4,29$ nM) war gegenüber SOCE1 ($140,48 \pm 5,96$ nM) deutlich reduziert: Es zeigte sich eine Abnahme um $38,43 \pm 1,90\%$ ($n=79$, $p<0,001$; Abb. 20).

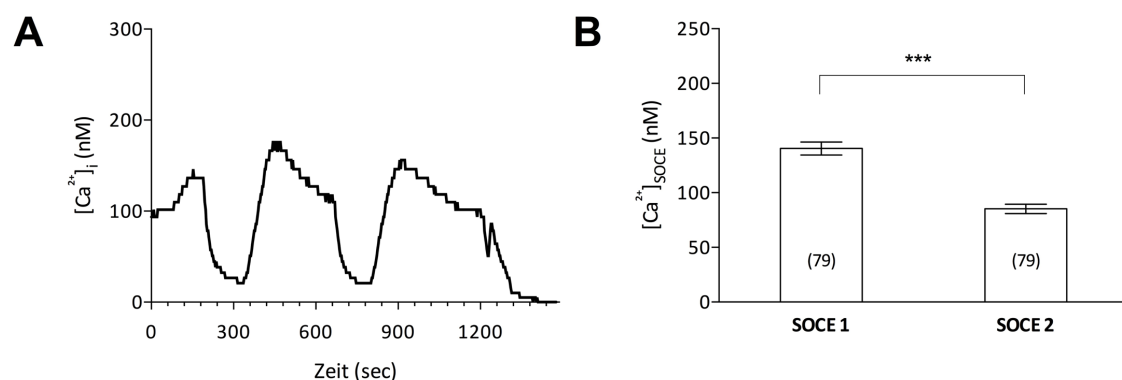


Abb. 20 SOCE im Doppel-Paradigma mit dem LTCC-Blocker (R)-(+)-Bay K 8644 in untransfizierten ARPE-19-Zellen

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer untransfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite Anstieg dem SOCE1 und der dritte Anstieg dem SOCE2 unter Inhibition von LTCC mit (R)-(+)-Bay K 8644. (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich einen hochsignifikanten Unterschied ($p<0,001$).

4.3.2 Einfluss von Wildtyp Bestrophin-1 auf den SOCE und auf die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen

Dieser Abschnitt widmet sich der Fragestellung, ob Bestrophin-1 den SOCE oder die Beteiligung von LTCC am SOCE in ARPE-19-Zellen beeinflusst.

Um eine etwaige Beeinflussung des SOCE oder der Beteiligung von LTCC am SOCE durch das Transfektionsprozedere *per se* auszuschließen, wurden die bisher beschriebenen Experimente zunächst an mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten ARPE-19-Zellen wiederholt und die jeweiligen Ergebnisse mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit untransfizierten Zellen verglichen.

Erst dann sollten die Experimente an mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* transfizierten ARPE-19-Zellen durchgeführt werden.

4.3.2.1 Einfluss der Transfektionsprozedur auf den SOCE und auf die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen

Zunächst wurden im Doppel-Paradigma die jeweils ersten SOCEs aller mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten Zellen verglichen mit den jeweils ersten SOCEs der untransfizierten Zellen desselben Experiments (direkte Kontrollen). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,13$, *Abb.21*) festgestellt werden: $119,06 \pm 7,23$ nM (Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP*, $n=41$) vs. $141,42 \pm 10,88$ nM (keine Transfektion, $n=39$).

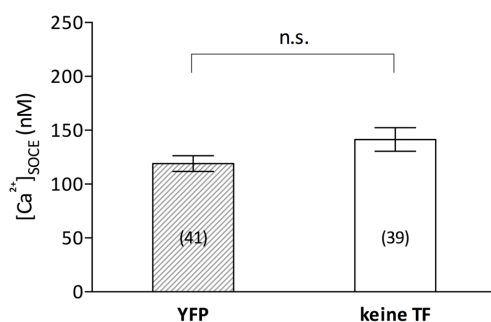


Abb.21 Einfluss der Transfektionsprozedur auf den SOCE

Der SOCE in mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten Zellen zeigt sich nicht-signifikant verändert zum SOCE in untransfizierten ARPE-19-Zellen.

Wie bereits bei untransfizierten ARPE-19-Zellen beobachtet werden konnte, zeigte sich in den Kontrollexperimenten ohne Kanalblocker auch nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP* SOCE2 mit $106,35 \pm 12,26$ nM im Vergleich zu SOCE1 mit $99,76 \pm 11,20$ nM nur unwesentlich verändert ($n=15$, $p=0,16$, Abb. 22).

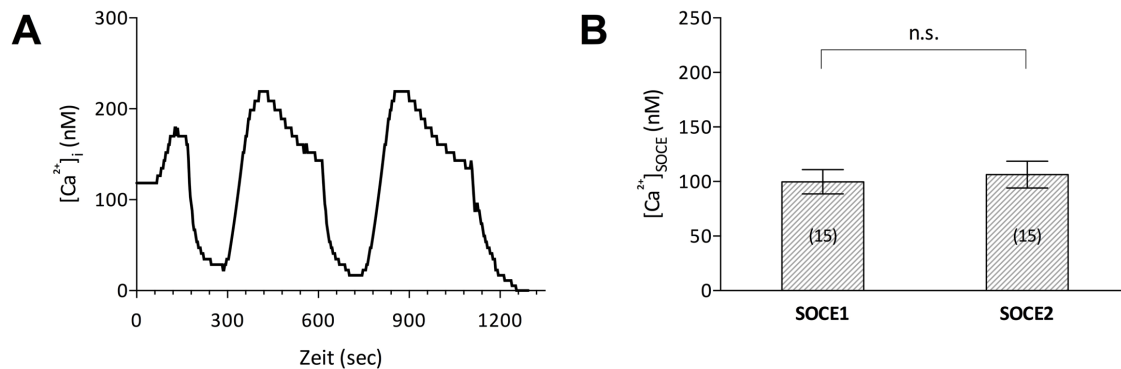


Abb. 22 SOCE im Doppel-Paradigma ohne Kanalblocker in ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP*

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite bzw. dritte Anstieg dem SOCE1 bzw. SOCE2 (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich keinen signifikanten Unterschied.

Zur Überprüfung der Beteiligung von LTCC am SOCE in mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten Zellen wurde das bereits beschriebene Doppel-Paradigma unter Einsatz des LTCC-Blockers (R)-(+)-Bay K 8644 während des zweiten SOCE durchgeführt. SOCE1 lag bei $130,19 \pm 8,83$ nM, wohingegen sich SOCE2 unter $10 \mu\text{M}$ (R)-(+)-Bay K 8644 mit $74,18 \pm 7,14$ nM deutlich reduziert zeigte. Dies entsprach einer Abnahme um $44,43 \pm 2,81\%$ ($n=26$, $p<0,001$, Abb. 23).

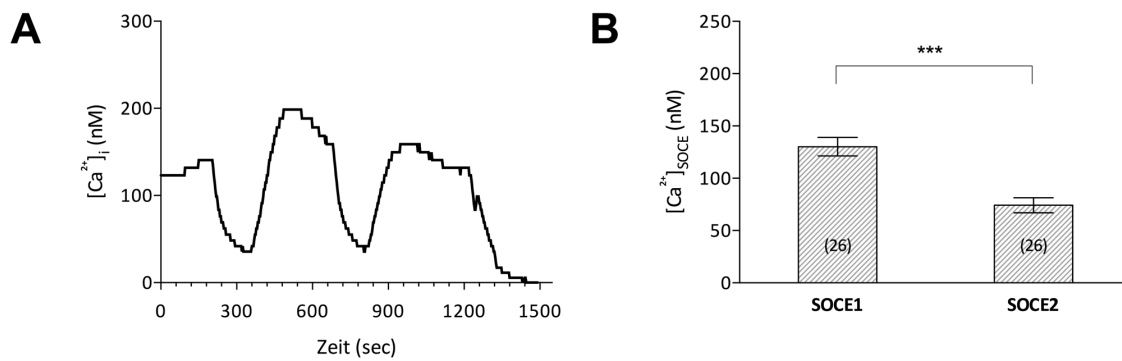


Abb. 23 SOCE im Doppel-Paradigma mit dem LTCC-Blocker (R)-(+)-Bay K 8644 in ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP*

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite Anstieg dem SOCE1 und der dritte Anstieg dem SOCE2 unter Inhibition von LTCC mit (R)-(+)-Bay K 8644. (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

Ebenso wenig hatte die Transfektion *per se* einen Einfluss auf das Ausmaß der Inhibition von LTCC durch (R)-(+)-Bay K 8644. Der Vergleich der prozentualen Abnahmen des SOCE bei Applikation von (R)-(+)-Bay K 8644 zwischen mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten ($44,43 \pm 2,81\%$, $n=26$) und untransfizierten Zellen ($38,43 \pm 1,90\%$, $n=79$) zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,11$, *Abb.24*).

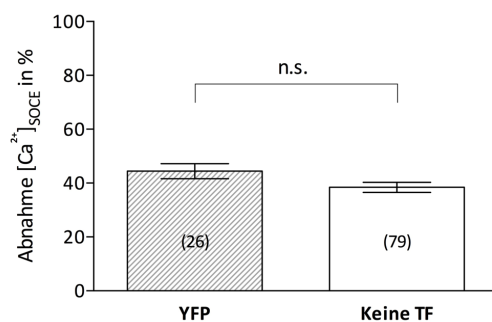


Abb.24 Einfluss der Transfektionsprozedur auf die Beteiligung von LTCC am SOCE

Vergleich der prozentualen Abnahme des SOCE durch Blockade mit (R)-(+)-Bay K 8644 in ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP* mit untransfizierten ARPE-19-Zellen

4.3.2.2 Einfluss von Wildtyp Bestrophin-1 auf den SOCE und auf die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen

Vor dem Hintergrund, dass die Transfektionsprozedur *per se* keinen Einfluss auf den SOCE oder die Beteiligung von LTCC am SOCE hatte, konnte nun der Einfluss von Bestrophin-1 in

diesem Zusammenhang beurteilt werden. Hierzu wurden ARPE-19-Zellen mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* transfiziert.

Die Calcium Imaging-Experimente zeigten, dass SOCE1 in diesen Zellen bei $164,05 \pm 18,61$ nM lag und unwesentlich verändert war im Vergleich zu den direkten Kontrollen desselben Experiments, welche einen SOCE1 von $162,43 \pm 13,94$ nM ($n=13$) aufwiesen (in Abbildung nicht dargestellt).

Durch den Einsatz von $10 \mu\text{M}$ (R)-(+)-Bay K 8644 zeigte sich ein deutlich reduzierter SOCE2: Während SOCE1 (ohne Applikation von Blockern) bei $164,05 \pm 18,61$ nM lag, betrug SOCE2 $92,09 \pm 13,43$ nM, hatte im Vergleich zu SOCE1 durch die Inhibition von LTCC also um $45,53 \pm 5,10\%$ abgenommen ($n=12$, $p<0,001$, Abb. 25 (B)). Diese Abnahme zeigte sich im Vergleich zu den Ergebnissen aus den Experimenten mit *pBudCE4.1-YFP* im Wesentlichen unverändert ($44,43 \pm 2,81\%$, $n=26$, $p=0,84$, Abb. 25 (C)).

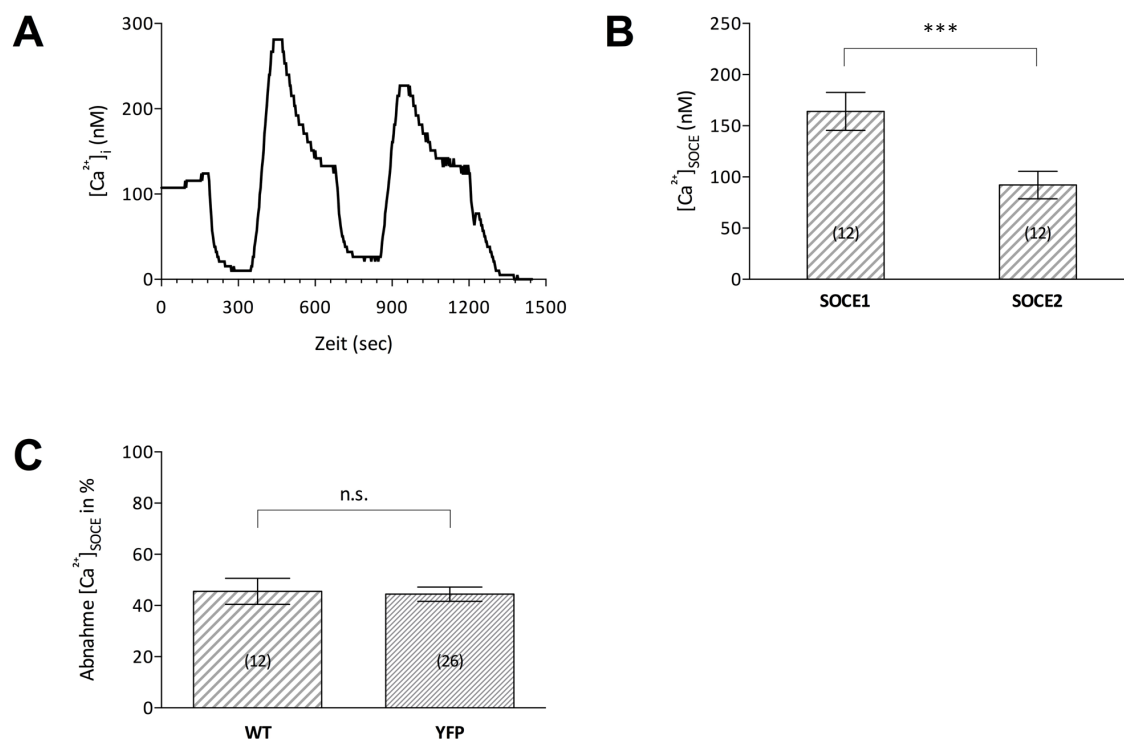


Abb. 25: Einfluss von Bestrophin1-WT auf die Beteiligung von LTCC am SOCE

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* transfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite Anstieg dem SOCE1 und der dritte Anstieg dem SOCE2 unter Inhibition von LTCC mit (R)-(+)-Bay K 8644. (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich einen hochsignifikanten Unterschied ($p<0,001$). (C) Die prozentualen Abnahmen von WT und YFP (jeweils nach Applikation des LTCC-Inhibitors (R)-(+)-Bay K 8644) unterscheiden sich nicht voneinander.

4.3.3 Einfluss von mutantern Bestrophin-1 auf den SOCE und auf die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen

Zur Untersuchung, ob mutante Bestrophine den SOCE oder die Beteiligung von LTCC am SOCE beeinflussen, wurden ARPE-19-Zellen mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P* bzw. *pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C* bzw. *pBudCE4.1-YFP-hbest1F305S* transfiziert.

SOCE1 zeigte sich bei jeder untersuchten Mutation unverändert zu den jeweiligen direkten Kontrollen desselben Experiments (*pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P*: $130,65 \pm 19,81$ nM (n=13) vs. $120,22 \pm 10,33$ nM (untransfiziert, n=18), $p=0,80$; *pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C*: $143,78 \pm 14,92$ nM (n=20) vs. $159,55 \pm 11,92$ nM (untransfiziert, n=12), $p=0,45$; *pBudCE4.1-YFP-hbest1F305S*: $166,22 \pm 32,13$ nM (n=7) vs. $162,43 \pm 17,40$ nM (untransfiziert, n=12), $p=0,91$) (in Abbildung nicht gezeigt).

Die Calcium Imaging-Experimente unter Verwendung von $10 \mu\text{M}$ (R)-(+)-Bay K 8644 erbrachten folgende Ergebnisse:

Für die mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P* transfizierten Zellen lag SOCE1 bei $130,65 \pm 19,81$ nM und SOCE2 bei $76,66 \pm 12,90$ nM, die prozentuale Abnahme lag also bei $41,00 \pm 3,12\%$ (n=13, $p<0,001$, Abb. 26 (B)).

In den mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C* transfizierten Zellen war SOCE2 mit $67,67 \pm 8,26$ nM im Vergleich zu SOCE1 mit $143,78 \pm 14,92$ nM um $52,88 \pm 2,59\%$ vermindert (n=20, $p<0,001$, Abb. 27 (B)).

Die mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1F305S* transfizierten Zellen zeigten eine Abnahme um $39,78 \pm 5,23\%$ (n=7, $p=0,02$ Abb. 28 (B)) von SOCE2 ($98,65 \pm 15,40$ nM) verglichen mit SOCE1 ($166,22 \pm 32,13$ nM).

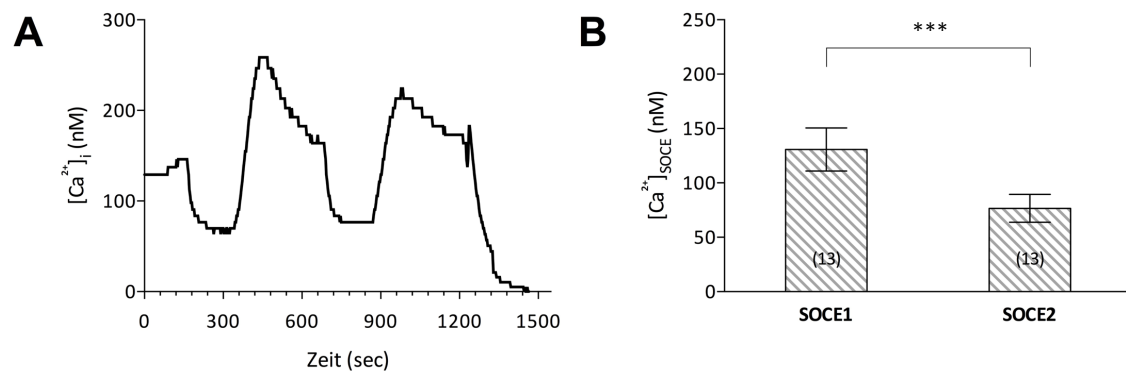


Abb. 26 SOCE im Doppel-Paradigma mit dem LTCC-Blocker (R)-(+)-Bay K 8644 in ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P*

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1T6P* transfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite Anstieg dem SOCE1 und der dritte Anstieg dem SOCE2 unter Inhibition von LTCC mit (R)-(+)-Bay K 8644. (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

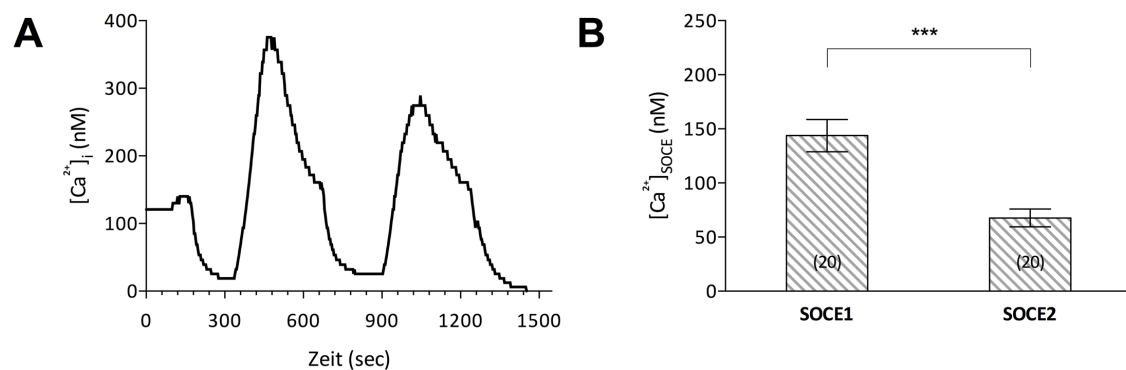


Abb. 27 SOCE im Doppel-Paradigma mit dem LTCC-Blocker (R)-(+)-Bay K 8644 in ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C*

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C* transfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite Anstieg dem SOCE1 und der dritte Anstieg dem SOCE2 unter Inhibition von LTCC mit (R)-(+)-Bay K 8644. (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

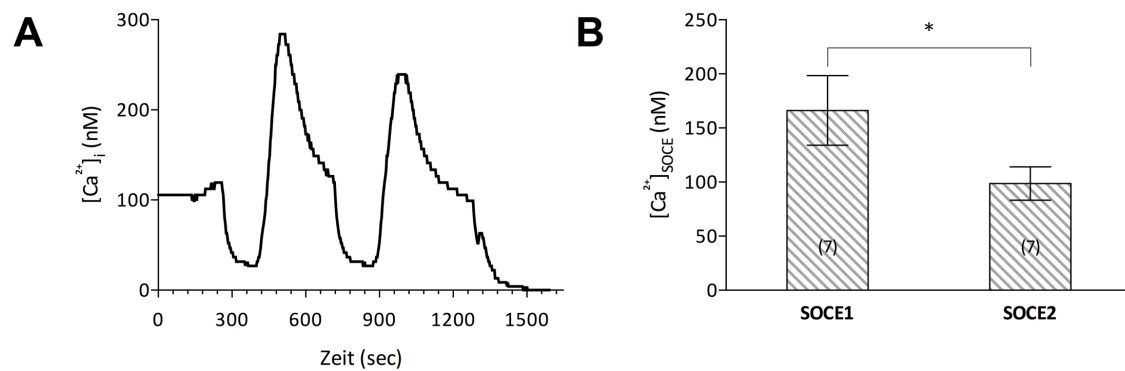


Abb. 28 SOCE im Doppel-Paradigma mit dem LTCC-Blocker (R)-(+)-Bay K 8644 in ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1F305S*

(A) Verlauf der Calcium-Konzentrationen während eines Experiments am Beispiel einer mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1F305S* transfizierten ARPE-19-Zelle: Der erste Anstieg entspricht dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Applikation von Thapsigargin, der zweite Anstieg dem SOCE1 und der dritte Anstieg dem SOCE2 unter Inhibition von LTCC mit (R)-(+)-Bay K 8644. (B) SOCE1 und SOCE2 zeigen im Vergleich einen signifikanten Unterschied ($p=0,02$).

Die prozentualen Abnahmen des SOCE durch die Inhibition von LTCC wurden mit denen von ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP* bzw. nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* verglichen (siehe Abb. 29). Lediglich der Vergleich von Bestrophin1-R218C mit YFP zeigte einen signifikanten Unterschied ($p=0,02$), alle anderen mutanten Bestrophine waren sowohl verglichen mit YFP (siehe Abb. 29 (A)) als auch mit Bestrophin1-WT (siehe Abb. 29 (B)) ebenso wie Bestrophin1-R218C verglichen mit Bestrophin1-WT nicht signifikant verändert.

Um dem Umstand Rechnung zu tragen, dass die direkten Kontrollen (die jeweils untransfizierten Zellen eines einzelnen Experiments) nicht immer konstante Werte für den SOCE und für die Abnahmen nach Inhibition von LTCC zeigten, wurde eine Normalisierung aller prozentualen Abnahmen vorgenommen. Dabei wurden die Werte jeweils auf die Mittelwerte der direkten Kontrollen bezogen. Die Mittelwerte der prozentualen Abnahmen der direkten Kontrollen wurden mit 100% gleichgesetzt (siehe Abb. 29 (C)). Bei Betrachtung der normalisierten prozentualen Abnahmen können keine signifikanten Unterschiede mehr vermerkt werden: Weder innerhalb der Experimente (transfizierte Zellen vs. untransfizierte direkte Kontrollen) noch zwischen den transfizierten Zellgruppen (YFP, Bestrophin1-WT, mutante Bestrophine) untereinander.

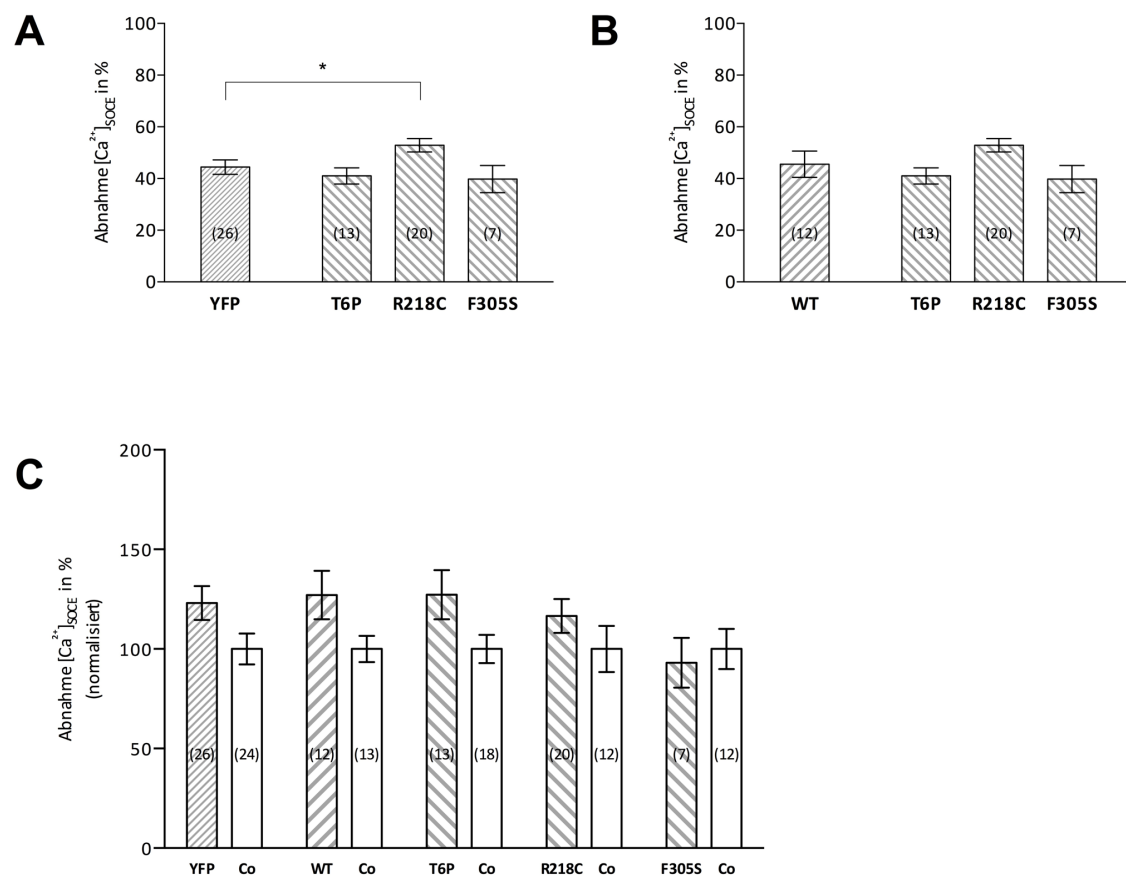


Abb. 29 Einfluss von mutantern Bestrophin-1 auf die Beteiligung von LTCC am SOCE

(A) Im Vergleich mit den mit *pBudCE4.1-YFP* transfizierten ARPE-19-Zellen zeigen lediglich Zellen, die *pBudCE4.1-YFP-hbest1R218C* exprimieren, einen signifikanten Unterschied ($p=0,02$) bezüglich der prozentualen Abnahmen von SOCE nach Applikation von (R)-(+)-Bay K 8644. (B) Dagegen kann verglichen mit ARPE-19-Zellen nach Transfektion mit *pBudCE4.1-YFP-hbest1WT* keine Bestrophin1-Mutante einen signifikanten Unterschied aufweisen. (C) Nach Normalisierung der einzelnen Zellgruppen auf die Mittelwerte ihrer jeweiligen direkten untransfizierten Kontrollen können keine Signifikanzen vermerkt werden.

5 Diskussion

5.1 Aussagekraft der Methoden

5.1.1 Calcium Imaging-Experimente

Die Stärken des gewählten Settings für die Calcium Imaging-Experimente liegen insbesondere im Einsatz des im Methodenteil (3.6.1) beschriebenen Doppel-Paradigma. Mögliche Schwankungen der verschiedenen Einzelexperimente kamen dadurch nicht zum Tragen und es konnte im selben Experiment sowohl das Ausmaß des SOCE als auch die Blockade desselben durch den eingesetzten LTCC-Inhibitor (R)-(+)-Bay K 8644 untersucht werden.

Hinzu kommt die direkte Vergleichbarkeit innerhalb eines Einzelexperiments von transfizierten mit nicht-transfizierten Zellen, den direkten Kontrollen. Außerdem konnten zusätzliche potentielle Störungen der Ergebnisse durch das Transfektions-Prozedere *per se* ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden Experimente an mit YFP allein transfizierten Zellen durchgeführt und anschließend mit den Ergebnissen der anderen Transfektionssgruppen verglichen.

Zu bedenken gilt es, dass Calcium Imaging im Gegensatz zu anderen Methoden, wie z.B. *Patch Clamp*, nicht die Ströme durch Ionenkanäle direkt misst und auch nicht direkt die Calcium-Konzentration in einer Zelle messen kann, sondern wie im Methodenteil (3.6.1) beschrieben Fluoreszenzmuster detektiert. Erst daraus werden entsprechend einer Kalibrierung am Ende des Experiments die Calcium-Konzentrationen errechnet. Wenn sich also die Kalibrierung als fehlerbehaftet erweist, sind auch die berechneten absoluten Werte der Calcium-Konzentrationen inkorrekt. Daher wurden Messdaten mit fehlerhafter Kalibrierung von der Auswertung ausgeschlossen. Hingegen ist die Berechnung des Anteils von LTCC am SOCE weitestgehend unabhängig von der Kalibrierung, da hierfür beide SOCEs lediglich in Relation zueinander gesetzt werden.

Außerdem ergibt sich die aktuelle Calcium-Konzentration im Zytosol aus der Differenz zwischen Einstrom von extrazellulär und Aufnahme in intrazelluläre Speicher (wobei die Aufnahme von Calcium in das Endoplasmatische Retikulum durch den Einsatz des SERCA-Inhibitors Thapsigargin verhindert wird) bzw. Ausstrom aus der Zelle und Ausstrom aus

Speichern. Findet also zum Beispiel eine im Verhältnis zum Einstrom raschere Aufnahme von Calcium in intrazelluläre Speicher statt, ist der gemessene zytosolische Calciumwert geringer als es dem tatsächlichen Einstrom von extrazellulär entspricht.

Das beschriebene Manöver zur Provokation eines SOCE spiegelt zwar nicht die natürliche Art und Weise wieder, wie der SOCE *in vivo* ausgelöst wird (s.u.), es stellt jedoch eine sehr effektive Methode dar. Sie hat sich in vielen Publikationen als Standard etabliert, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer Labore gegeben ist.

Physiologischerweise wird durch das Binden eines Liganden (z.B. Hormone, Neurotransmitter) an einen zellmembranständigen Rezeptor eine Signalkaskade ausgelöst, an deren Ende die Abspaltung von IP_3 aus dem Membranlipid PIP_2 steht. IP_3 führt über IP_3 -Rezeptoren in der ER-Membran zur ER-Speicherentleerung, wodurch wiederum über die beschriebene STIM1-Orai1-Interaktion der SOCE aktiviert wird (107).

Daneben betrachtet sind die Bedingungen, die im Calcium Imaging-Experiment geschaffen werden, doch recht extrem: Auf ein Calcium-freies extrazelluläres Milieu folgt ein abrupter Wechsel auf ein Calcium-haltiges Milieu, zusätzlich wird eine Wiederaufnahme von Calcium in die ER-Speicher durch eine Blockade von SERCA verhindert.

In vivo spiegelt die zytosolische Calciumkonzentration das Integral aus Aktivitäten von Kanälen, Pumpen, Transportern, intrazellulären Puffern, Membranpotentialen und Organellen wider, welche alle wiederum über Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration miteinander interagieren können (107). Bereits kleine Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration können zu veränderten Zellfunktionen führen.

Die Calcium Imaging-Ergebnisse beruhen also auf einem artifiziellen und vereinfachten Modell. Andererseits lässt sich natürlich nur so gezielt ein Kanal untersuchen und eine Hypothese prüfen, wenn möglichst viele Einfluss- und Störfaktoren ausgeschaltet werden. Der Ansatz fokussiert genau auf den Mechanismus zwischen Speicherentleerung und Calcium-Kanalaktivierung. Er lässt also die Beobachtung des reinen Vorgangs zwischen Speicher und Plasmamembran zu.

Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden sollte, sind die potentiellen Artefakte, die sich in einem heterologen Expressionssystem ergeben.

ARPE-19 ist eine humane RPE-Zelllinie, welche auf Proteinebene kein Bestrophin-1 aufweist (61). Dies hat den in der Einleitung (1.8.2) beschriebenen Vorteil, dass sie sich gut dazu eignet, generelle Hypothesen zur Bestrophin-Expression zu prüfen. Da *BEST1* in diesen Zellen durch Transfektion heterolog exprimiert wird, liegt es jedoch in überexprimierter Form vor. Eine Überexpression von Genen kann auf Proteinebene zu Artefakten führen. Das Protein-Trafficking kann dahingehend verändert sein, dass membranständige Proteine im Zytosol verbleiben oder eigentlich zytosolische Proteine in die Zellmembran gelenkt werden. Dies kann nicht nur die eigene Proteinfunktion, sondern auch die Funktion weiterer Kanäle behindern (65, 152, 153).

Neben dem aktiven Transport von Calcium in Kompartimente wie Mitochondrien, saure Endosomen oder ER besitzt die adulte humane RPE-Zelle Melanosomen, die hohe Mengen an Calcium aufnehmen können (17, 154). In der ARPE-19-Zelllinie jedoch ist wie auch in anderen RPE-Zelllinien (RPE-J, D407) und in Primärkulturen humaner RPE-Zellen der Signalweg der Melanogenese (Bildung von Melanin) deaktiviert, so dass diese keine Melanogenese mehr aufweisen (155). Es ist denkbar, dass dies Auswirkungen auf die Calcium-Speicherkapazität und daraus folgend auf das Calcium-Signaling der ARPE-19-Zellen haben kann.

5.1.2 Protein-Trafficking-Experimente

Die Immunfluoreszenz-Experimente dienen der Bestimmung der Lokalisation von Bestrophin-1 WT und den entsprechenden Mutanten nach Transfektion der im Calcium Imaging verwendeten ARPE-19-Zellen. Auf diese Weise sollten mögliche Unterschiede im Calcium Imaging mit möglichen Unterschieden im Protein-Trafficking korreliert werden können.

Da sich die ARPE-19-Zellen im Calcium Imaging-Experiment im unpolarisierten Zustand befanden, wurden auch die Proteinlokalisierungsexperimente an unpolarisierten Zellen durchgeführt.

In einem weiteren Schritt könnten die *Trafficking*-Experimente an polarisierten Zellen wiederholt werden. Diese eignen sich besonders gut für Protein-*Trafficking*-Experimente. Neben der Unterscheidung zwischen zytosolischer und membranständiger Proteinlokalisation kann in polarisierten Zellen auch zwischen apikaler und basolateraler Lokalisation differenziert werden. Hierfür werden beispielsweise MDCKII-Zellen, welche sich für Protein-*Trafficking*-Experimente etabliert haben (156), auf Transwell-Filtern bis zur stabilen Konfluenz, welche über den transepithelialen Widerstand gemessen werden kann, gezüchtet. Der transepitheliale Widerstand spiegelt die Ausbildung von *tight junctions* wider, welche wiederum die polarisierte Zelle in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment teilen. Das zu untersuchende Protein kann sich also entweder intrazellulär oder in der Zellmembran befinden und hier kann weiter eine apikale (oberhalb der *tight junctions*) von einer basolateralen Lokalisation (unterhalb der *tight junctions*) unterschieden werden. Die Frage nach Membranständigkeit des zu untersuchenden Proteins (z.B. rote Färbung im immunzytochemischen *Staining*) kann durch ein *Co-Staining* (z.B. grüne Färbung) mit einem membranständigen Protein, z.B. MCT1 (Monocarboxylat-Transporter 1), beantwortet werden. Ein Konfokalmikroskop weist ein besonders hohes Auflösungsvermögen auf und nach der getrennten Detektion beider Protein-Signale (rotes bzw. grünes *Staining*) können im sogenannten *Merge*-Modus exakt diejenigen Pixel ausgezählt werden, die durch eine Co-Lokalisation gelb erscheinen. Ein *Co-Staining* mit dem *tight junctions*-Protein ZO-1 (zonula occludens-1) lässt zusätzlich eine Differenzierung in apikal oder basolateral zu.

Im Gegensatz dazu befanden sich die ARPE-19-Zellen in diesen Experimenten zum einen in nicht-polarisiertem Zustand, zum anderen erfolgten kein *Co-Staining* mit Membran-Markern und keine Signal-Detektion mittels Konfokalmikroskopie.

Ein weiterer Aspekt bei der Interpretation der Ergebnisse sollte sein, dass ARPE-19-Zellen selbst auf Proteinebene kein Bestrophin-1 aufweisen, also kein endogenes, sondern ein heterologes Expressionssystem besteht. Wie bereits unter 5.1.1 dargelegt, ist die damit verbundene Überexpression als mögliche Fehlerquelle in *Trafficking*-Experimenten bekannt. Auch Bestrophin-Mutanten im Speziellen zeigten bei diversen Arbeitsgruppen unterschiedliches *Trafficking* in Abhängigkeit davon, ob sie in endogenen oder in heterologen Modellen untersucht wurden. Als Beispiel kann hier die mit Morbus Best

assoziierte Mutation W93C genannt werden, die in MDCKII-Zellen im Zytosol lokalisiert ist (157), hingegen in fhRPE-Zellen (70, 157) und im RPE von Ratten-Augen (158) ein regelrechtes *Trafficking* in die basolaterale Membran aufweist. Heterologe Expressionssysteme (z.B. in MDCKII-Zellen) eignen sich also gut, um generell darzustellen, dass unterschiedliche Mutanten ein unterschiedliches Protein-*Trafficking* aufweisen können (*proof-of-principle*), die Ergebnisse sollten aber idealerweise in nativen humanen RPE-Modellen validiert werden.

5.2 Protein-*Trafficking* von Bestrophin-1 (Wildtyp und Mutanten) in ARPE-19-Zellen

Durch Immunfluoreszenz-Experimente wurde in dieser Arbeit die Lokalisation von Bestrophin-1 WT und den entsprechenden Mutanten in Bezug auf die Plasmamembran in ARPE-19-Zellen beurteilt. Bestrophin-1 WT zeigte lediglich eine anteilige Membranständigkeit, während die Mutanten alle ausschließlich im Zytosol lokalisiert waren.

Im Gegensatz stehend zur in dieser Arbeit gezeigten lediglich anteiligen Membranständigkeit von Bestrophin-1 WT in ARPE-19-Zellen, konnte in anderen Zellen und Geweben mehrfach belegt werden, dass Bestrophin-1 an der basolateralen Membran lokalisiert ist. Marmorstein *et al.* untersuchten im Jahr 2000 erstmals die Lokalisation von Bestrophin-1. Sie zeigten immunhistochemisch und konfokal-mikroskopisch in Makaken- und Schweine-Augen, dass sich Bestrophin-1 als integrales Membranprotein in der basolateralen Membran befindet (61). Weitere Arbeiten folgten und bestätigten diese Ergebnisse in anderen nativen Geweben: bei Menschen (147, 159), Mäusen (78, 160), Ratten (158), Hunden (161), Rhesusaffen (146), iPSC-RPE-Zellen (71, 72, 162, 163) und fhRPE-Zellen (70, 157). Auch in heterologen Expressionssystemen (MDCKII-, RPE-J-Zellen) wiederholten sich die Ergebnisse aus den nativen Modellen (60, 61, 77, 150, 157, 164, 165). MDCKII-Zellen exprimieren als kanine Nierenzellen selbst kein *BEST1*, haben sich aber in ihrer polarisierten Form als Standard-Modell für Protein-*Trafficking* etabliert (156). Die Ratten-RPE-Zelllinie RPE-J besitzt ebenso, wie auch ARPE-19-Zellen, kein Bestrophin. Die genannten Zelllinien, ebenso wie HEK-293-Zellen, eignen sich also, mittels heterologer Expression das Protein-*Trafficking* und/oder die Funktionen (z.B. Ionenkanal-Eigenschaften) von Proteinen und deren Mutanten zu untersuchen. In einer Arbeit von

Reichart *et al.* wurden auch ARPE-19-Zellen mit Bestrophin-1 sowie Cav1.3 und der LTCC β 4-Untereinheit transfiziert und es zeigte sich eine vorwiegend zellmembranständige Lokalisation der transfizierten Proteine (121). Das Protein-Trafficking von Bestrophin-1-Mutanten speziell in ARPE-19-Zellen wurde in der Literatur bisher nicht untersucht.

Milenkovic *et al.* verwendeten polarisierte MDCKII-Zellen zur systematischen Beurteilung der Lokalisation von mit Morbus Best assoziierten Bestrophin-1-Mutanten (150). Wie in der Einleitung (1.8.3) beschrieben, waren die meisten Mutanten im Zytosol lokalisiert, darunter auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mutationen T6P und F305S. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit stimmen also mit denen von Milenkovic *et al.* überein und entsprechen zudem einer weiteren Arbeit von Johnson *et al.*, die ebenso eine zytosolische Proteinlokalisierung für die Mutante T6P bestätigt (165). Die Mutation R218C hingegen verhielt sich in ihrem Protein-Trafficking in den hier untersuchten ARPE19-Zellen anders als in den MDCKII-Zellen. Während bei Milenkovic *et al.* eine fast dem Wildtyp entsprechende Membranständigkeit bestand, fand sich die Mutante in den ARPE-19-Zellen ausschließlich im Zytosol. Auch andere Arbeitsgruppen wiesen für die Mutante R218C eine Lokalisation in der basolateralen Membran bei MDCKII- (157), fhRPE- (157) und Ratten-RPE-Zellen (158) bzw. in der Plasmamembran (ohne Differenzierung in apikal oder basolateral) bei RPE-J-Zellen (77) nach. Erneut sollte beachtet werden, dass die ARPE-19-Zellen in der vorliegenden Arbeit einerseits in nicht-polarisiertem Zustand untersucht wurden und sich diese andererseits als humane RPE-Zelllinie von den kaninen MDCKII-Zellen bzw. den nativen fhRPE- und Ratten-RPE-Zellen unterscheiden.

5.3 SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in ARPE-19-Zellen LTCC maßgeblich am SOCE beteiligt sind. Durch eine Blockade von LTCC wurde der SOCE um etwa 40% reduziert. Möglicherweise liegt eine noch größere Beteiligung von LTCC am SOCE vor, bedenkt man die verglichen mit Cav1.2 relativ niedrige Sensitivität des in RPE-Zellen vorherrschenden Cav1.3-Subtyps gegenüber Dihydropyridinen (siehe Einleitung 1.8.1). Wie den Arbeiten von Cordeiro *et Strauß* und Mas *et al.* zu entnehmen ist, beteiligen sich auch Orai1-Kanäle ganz maßgeblich am SOCE in RPE-Zellen (88, 89). In

dieser Arbeit wurde erstmals das beschriebene Doppel-Paradigma angewendet, um eine Beteiligung von LTCC am SOCE in RPE-Zellen zu überprüfen. In einem ähnlichen Setting ohne Doppel-Paradigma beobachteten Mergler *et Strauß*, dass in Ratten-RPE-Zellen ein durch Speicherentleerung provoziertes Calciumeinstrom durch den Einsatz von Nifedipin deutlich reduziert werden konnte. Simultan durchgeführte *Whole cell Patch Clamp*-Experimente zeigten während des maximalen Calcium-Anstiegs eine erhöhte Stromamplitude und somit Aktivität von LTCC (110).

5.4 Einfluss von Bestrophin-1 Wildtyp auf den SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der SOCE in ARPE-19-Zellen durch eine heterologe Expression von *BEST1* nicht verändert wird. Eine Transfektion mit Bestrophin-1-WT beeinflusste weder den SOCE noch die Beteiligung von LTCC am SOCE.

In primären Schweine-RPE-Zellen, welche endogen *BEST1* exprimieren, konnte hingegen durchaus ein Effekt von Bestrophin-1 auf den SOCE nachgewiesen werden (88). Experimente mit *best-1* siRNA zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine um etwa 70% reduzierte SOCE-Amplitude. Hier ist der unter 5.1.1 beschriebene mögliche Einfluss einer heterologen Überexpression im Gegensatz zur endogenen Expression auf die unterschiedlichen Ergebnisse in Betracht zu ziehen. Der Einfluss von Bestrophin-Mutanten wurde von Mas *et al.* nicht untersucht. Ebenso wenig wurde in der Arbeit eine Beteiligung von LTCC am SOCE bzw. eine Interaktion zwischen Bestrophin-1 und LTCC und eine damit verbundene potentielle Beeinflussung des SOCE untersucht.

Dass Bestrophin-1 mit LTCC vom Cav1.3-Typ in retinalen Pigmentepithelzellen interagiert, zeigen zum einen Co-Immunoprecipitationsexperimente, die eine direkte Protein-Protein-Interaktion belegen. Diese Interaktion findet zwischen SH3-Domänen der Beta-Untereinheit der LTCC und einem hochkonservierten Cluster von Prolin-reichen Motiven zwischen der Aminosäureposition 468 und 486 am C-Terminus von Bestrophin-1 statt (79, 121, 122). Zum anderen konnte die Interaktion zwischen Bestrophin-1 und LTCC vom Cav1.3-Typ funktionell in mehreren Studien durch *Whole cell Patch Clamp* gezeigt werden. In diesen Experimenten wirkte sich Bestrophin-1 auf die Aktivierungskinetik, die

spannungsabhängige Aktivierung und/oder die Strom-Amplitude von LTCC aus. Bestrophin-1 beschleunigte die zeitabhängige Aktivierung in RPE-J-Zellen (77) und CHO-Zellen (121, 122), führte zu einer Verlagerung des Aktivierungspotentials in Richtung negativerer Potentiale in RPE-J-Zellen (77) bzw. in Richtung positiverer Potentiale in mit Cav1.3-transfizierten HEK293-Zellen (79) und bewirkte eine Verminderung der Cav1.3-LTCC-Aktivität in mit Cav1.3-transfizierten CHO-Zellen (121, 122) und HEK293-Zellen (79). Bei den letztgenannten lag die Inhibition bei 85%.

Auch in HEK293-Zellen, welche den Cav1.2-Subtyp exprimieren, wurde eine Interaktion zwischen Bestrophin-1 und LTCC gezeigt. Durch eine Transfektion mit Bestrophin-1 wurde dort die zeitabhängige Aktivierung beschleunigt (57).

5.5 Einfluss von Bestrophin-1-Mutanten auf den SOCE und die Beteiligung von L-Typ-Calcium-Kanälen am SOCE in ARPE-19-Zellen

Mutante Bestrophine beeinflussten in dieser Arbeit weder den SOCE noch die Beteiligung von LTCC am SOCE signifikant.

Eine Mutation von Bestrophin-1 bewirkte hingegen in den unter 5.4 beschriebenen *Patch Clamp*-Experimenten eine Veränderung der zeitabhängigen Aktivierung und Inaktivierung von LTCC (Verlangsamung durch die Mutation W93C und Beschleunigung durch die Mutation R218C in RPE-J-Zellen) (77) und einen Verlust der Fähigkeit die Cav1.2-LTCC-Aktivität zu beschleunigen (Mutation R141H in HEK-293-Zellen) (57). Bei Yu *et al.* wurde die Cav1.3-LTCC-Aktivität in transfizierten HEK-Zellen sowohl durch Bestrophin-1 WT (siehe 5.4) als auch durch die Mutanten D312N, R92S, G299E, G299R, G222E und A146K zu ca. 50% (G222E) bis 75% (R92S) inhibiert (79).

Eine folglich zu erwartende Beeinflussung der LTCC (und daraus folgend des Einflusses auf SOCE) durch Bestrophin-1 bzw. die entsprechenden Mutanten bei ARPE-19-Zellen ließ sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht aufweisen.

5.6 Einordnung der Ergebnisse in die Hypothese zum Pathomechanismus bei Morbus Best

In dieser Arbeit konnte ein Einfluss mutanter Bestrophine auf den SOCE oder die LTCC-Beteiligung auf den SOCE ausgeschlossen werden. Wie bereits angeführt gibt es in der Literatur vielfach Hinweise darauf, dass der Pathomechanismus bei Morbus Best auf einem veränderten Calcium-Signaling beruht. Auch spricht vieles dafür, dass dieses veränderte Calcium Imaging durch einen Einfluss des mutanten Bestrophins auf LTCC zustande kommt. Dass die pathologische Interaktion zwischen mutantem Bestrophin-1 und LTCC zu einem veränderten Einfluss von LTCC auf den SOCE führt, konnte im Rahmen der Calcium Imaging-Experimente jedoch ausgeschlossen werden. Der Pathomechanismus bei Morbus Best beruht folglich auf einem anderen Mechanismus.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lassen sich folgende Punkte beobachten:

Die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Vektoren exprimieren *YFP* und *BEST1* (*WT* und *Mutanten*) simultan, was auf Proteinebene mittels Western Blot und immunzytochemischen Färbungen bestätigt werden konnte. Das im Calcium Imaging-Experiment angewendete Doppel-Paradigma ist valide, was in Kontrollexperimenten durch Replizierbarkeit des SOCE beim zweimaligen Auslösen bestätigt werden konnte. Der SOCE wird durch die Transfektionsprozedur *per se* nicht beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass in ARPE-19-Zellen LTCC am SOCE beteiligt sind und dass der Anteil dieses Calcium-Einstroms am SOCE bei etwa 40% liegt. Eine Transfektion der Zellen mit Bestrophin-1 WT oder den entsprechenden Mutanten konnte weder die LTCC-Beteiligung noch das Ausmaß des SOCE selbst beeinflussen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass der Pathomechanismus bei Morbus Best nicht auf einer Beeinflussung des SOCE bzw. einer veränderten LTCC-Beteiligung am SOCE durch mutiertes Bestrophin-1 beruht. Sollte Morbus Best ein verändertes Calcium-Signaling zugrunde liegen, worauf viele Daten hinweisen, ist hierfür ein anderer Mechanismus als eine durch Bestrophin-1-Mutation veränderte Beteiligung von LTCC am SOCE verantwortlich.

7 Anhang

7.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer, Gele, Medien und Kulturplatten

1 x Transfer-Puffer

100 mL 10 x SDS-Laufpuffer

200 mL Methanol

700 mL Aqua dest.

4 x TRIS-HCl/SDS Upper Buffer für SDS-Gele (0,5 M TRIS-HCl, 0,4%SDS, pH 6,8)

60,7 g TRIS

20 mL 20% SDS-Lösung

Mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen und pH = 6,8 mit HCl einstellen.

4 x TRIS-HCl/SDS Lower Buffer für SDS-Gele (1,5 M TRIS-HCl, 0,4%SDS, pH 8,8)

182,1 g TRIS

20 mL 20% SDS-Lösung

Mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen und pH = 8,8 mit HCl einstellen.

4% PFA-Lösung

4 g PFA

100 mL 1 x PBS

pH = 7,2-7,4 einstellen und filtern.

6 x SDS-Ladepuffer

7 mL 4 x TRIS-HCl/SDS (pH = 6,8)

3 mL Glycerol

1 g SDS

0,5 mL 1% Bromphenolblau-Lösung

10 x PBS

- 80 g NaCl (entspricht 1,37 M)
 - 2 g KCl (entspricht 27 mM)
 - 28,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (entspricht 80 mM)
 - 2 g KH_2PO_4 (entspricht 14 mM)
- Mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen.

10 x SDS-Laufpuffer (für PAA-Gele)

- 30,3 g TRIS
 - 144,2 g Glycin
 - 50 mL 20% SDS-Lösung
- Mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen.

10 x TBE

- 605,5 g TRIS (entspricht 1 M)
 - 256,8 g Borsäure (entspricht 0,83 M)
 - 18,6 g $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Mit Aqua dest. auf 5 L auffüllen.

Gelladepuffer

- 40% Sucrose
 - 0,05% Bromphenolblau
 - 0,05% Xylencyanol
- in 1x TBE

Low Salt (max. 5g/L) LB-Medium mit Zeocin

- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 10 g Trypton

Mit Aqua dest. auf 1000 mL auffüllen, pH = 7,5.

Nach dem Autoklavieren bis 40°C abkühlen lassen,

Antibiotikum Zeocin hinzufügen (50 µg/mL).

Low Salt (max. 5g/L) LB-Platten mit Zeocin

- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 10 g Trypton
- 15 g Agar

Mit Aqua dest. auf 1000 mL auffüllen, pH = 7,5.

Nach dem Autoklavieren bis 40°C abkühlen lassen,

Antibiotikum Zeocin hinzufügen (50 µg/mL), in Petrischalen ausgießen.

SDS-Polyacrylamid-Trenngel (10%)

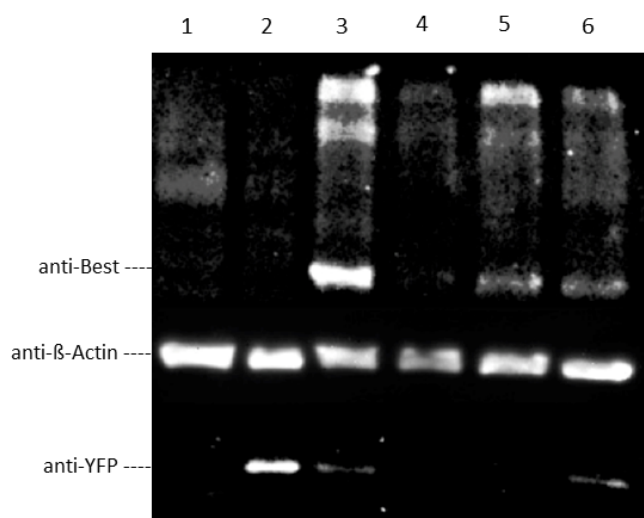
- 4,29 mL 30% PAA
- 3,25 mL 4 x TRIS-HCl/SDS (pH = 8,8)
- 5,46 mL Aqua dest.

SOC-Medium

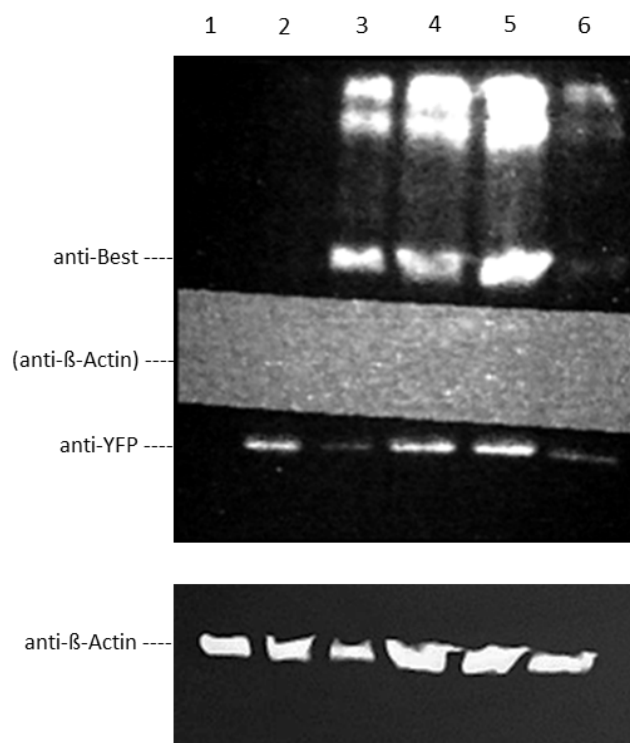
- 2,5 g Hefeextrakt
- 10 g Pepton
- 1 mL NaCl (5 M)
- 1,25 mL KCl (1 M)
- 5 mL MgCl₂ (1 M)
- 5 mL MgSO₄ (1 M)
- 10 mL Glukose-Lösung (1 M)

Mit Aqua dest. auf 500 mL auffüllen.

7.2 Western Blot Originalblots

**Abb. 30 Originalblot Nr. 1**

Von diesem Originalblot erscheinen die Spalten 3 (WT) und 6 (F305S) in der Zusammenstellung in Abb. 16 (*Übrige Spalten*: 1: untransfiziert, 2: YFP, 4: T6P, 5: R218C).

**Abb. 31 Originalblot Nr. 2**

(vor der UV-Belichtung geschnitten und anti-β-Actin separat belichtet). Von diesem Originalblot erscheinen die Spalten 1 (untransfiziert), 2 (YFP), 4 (T6P) und 5 (R218C) in der Zusammenstellung in Abb. 16 (*Übrige Spalten*: 3: WT, 6: F305S).

8 Literaturverzeichnis

1. Redewendung, Ursprung bis in die Antike zurückreichend
2. Scott AW, Bressler NM, Ffolkes S, Wittenborn JS, Jorkasky J. Public Attitudes About Eye and Vision Health. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(10):1111–8.
doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.2627
3. Giridhar P, Dandona R, Prasad MN, Kovai V, Dandona L. Fear of blindness and perceptions about blind people. The Andhra Pradesh Eye Disease Study. *Indian J Ophthalmol.* 2002;50(3):239–46.
4. Disease Awareness: Augenerkrankungen. produkt+markt Bevölkerungsbefragung in Deutschland. CATI Befragung; August 2014.
5. Eye on Eyesight Survey; 2010.
6. Chapman University Survey of American Fears; 2016.
7. Research!America. New Public Opinion Poll Reveals a Significant Number of Americans Rate Losing Eyesight as Having Greatest Impact on their Lives Compared to Other Conditions; 2014.
8. § 72 Blindenhilfe - Sozialgesetzbuch (SGB) Zwölftes Buch (XII) - Sozialhilfe - (SGB XII).
9. Certificate of Vision Impairment Department of Health, Explanatory Notes for Consultant Ophthalmologists and Hospital Eye Clinic Staff in England, August 2017.
10. Social Security Administration | Publication No. 05-10052 ICN 462554 | Unit of Issue — Package of 25 January 2018 (Recycle prior editions) If You're Blind Or Have Low Vision — How We Can Help Produced and published at U.S. taxpayer expense.
11. Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, Keeffe J, Kempen JH, Leasher J, Limburg H, Naidoo K, Pesudovs K, Resnikoff S, Silvester A, Stevens GA, Tahhan N, Wong TY, Taylor HR, Bourne R, Ackland P, Arditi A, Barkana Y, Bozkurt B, Bron A, Budenz D, Cai F, Casson R, Chakravarthy U, Choi J, Cicinelli MV, Congdon N, Dana R, Dandona R, Dandona L, Dekaris I, Del Monte M, Deva J, Dreer L, Ellwein L, Frazier M, Frick K, Friedman D, Furtado J, Gao H, Gazzard G, George R, Gichuhi S, Gonzalez V, Hammond B, Hartnett ME, He M, Hejtmancik J, Hirai F, Huang J, Ingram A, Javitt J, Jonas J, Joslin C, Kempen J, Khairallah M, Khanna R, Kim J, Lambrou G, van Lansingh C, Lanzetta P, Lim J, Mansouri K, Mathew A, Morse A,

- Munoz B, Musch D, Nangia V, PALAIOU M, Parodi MB, Pena FY, Peto T, Quigley H, Raju M, Ramulu P, Robin A, Rossetti L, Saaddine J, SANDAR MYA, Serle J, Shen T, Shetty R, Sieving P, Silva JC, Sitorus RS, Stambolian D, Stevens G, Taylor H, Tejedor J, Tielsch J, Tsilimbaris M, van Meurs J, Varma R, Virgili G, Volmink J, Wang YX, Wang N-L, West S, Wiedemann P, Wong T, Wormald R, Zheng Y. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2017;5(9):e888-e897. doi:10.1016/S2214-109X(17)30293-0
12. Schmidt RF, Thews G, editors. *Einführung in die Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 1976. 724 p. ger.
 13. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005;85(3):845–81. doi:10.1152/physrev.00021.2004
 14. LaVail MM. Outer segment disc shedding and phagocytosis in the outer retina. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1983;103 (Pt 4)397–404.
 15. Lamb TD, Pugh EN. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(3):307–80. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.03.001
 16. Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray IJ. Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(7):867–77.
 17. Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)*. 2001;15(Pt 3):384–9. doi:10.1038/eye.2001.141
 18. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000;45(2):115–34.
 19. Miceli MV, Liles MR, Newsome DA. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res*. 1994;214(1):242–9. doi:10.1006/excr.1994.1254
 20. Parver LM. Temperature modulating action of choroidal blood flow. *Eye (Lond)*. 1991;5 (Pt 2)181–5. doi:10.1038/eye.1991.32

21. Relvas LJM, Bouffieux C, Marcet B, Communi D, Makhoul M, Horckmans M, Blero D, Bruyns C, Caspers L, Boeynaems J-M, Willermain F. Extracellular nucleotides and interleukin-8 production by ARPE cells: potential role of danger signals in blood-retinal barrier activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(3):1241–6. doi:10.1167/iovs.08-1902
22. Kim YH, He S, Kase S, Kitamura M, Ryan SJ, Hinton DR. Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(5):651–9. doi:10.1007/s00417-009-1049-y
23. Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, Matsumura M. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res.* 2001;22(4):245–52.
24. Witmer AN, Vrensen GFJM, van Noorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(1):1–29.
25. Ban Y, Rizzolo LJ. Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;121(1):89–95.
26. Hughes BA, Miller SS, Machen TE. Effects of cyclic AMP on fluid absorption and ion transport across frog retinal pigment epithelium. Measurements in the open-circuit state. *J Gen Physiol.* 1984;83(6):875–99.
27. Miller SS, Steinberg RH. Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 1977;25(3):235–48.
28. SHACKEL B. Pilot study in electro-oculography. *Br J Ophthalmol.* 1960;44:89–113.
29. <http://www.bem.fi/book/28/28.htm> [Internet].
30. Arden GB, Constable PA. The electro-oculogram. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(2):207–48. doi:10.1016/j.preteyeres.2005.11.001
31. Constable PA, Bach M, Frishman LJ, Jeffrey BG, Robson AG. ISCEV Standard for clinical electro-oculography (2017 update). *Doc Ophthalmol.* 2017;134(1):1–9. doi:10.1007/s10633-017-9573-2.
32. Bach M, Kellner U. Elektrophysiologische Diagnostik in der Ophthalmologie. *Der Ophthalmologe.* 2000;97(12):898–920. doi:10.1007/s003470070018

33. Krill AE, Morse PA, Potts AM, Klien BA. Hereditary vitelliruptive macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 1966;61(6):1405–15.
34. François J, Rouck A de, Fernandez-Sasso D. L'électro-oculographie dans les dégénérescences vitelliformes de la macula [Electro-oculography in macular degeneration]. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 1966;143547–52. fre.
35. Boon CJF, Klevering BJ, Leroy BP, Hoyng CB, Keunen JEE, den Hollander AI. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(3):187–205. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.04.002
36. Cross HE, Bard L. Electro-oculography in Best's macular dystrophy. *Am J Ophthalmol.* 1974;77(1):46–50.
37. Ponjavic V, Eksandh L, Andréasson S, Sjöström K, Bakall B, Ingvast S, Wadelius C, Ehinger B. Clinical expression of Best's vitelliform macular dystrophy in Swedish families with mutations in the bestrophin gene. *Ophthalmic Genet.* 1999;20(4):251–7.
38. Renner AB, Tillack H, Kraus H, Krämer F, Mohr N, Weber BHF, Foerster MH, Kellner U. Late onset is common in best macular dystrophy associated with VMD2 gene mutations. *Ophthalmology.* 2005;112(4):586–92. doi:10.1016/j.ophtha.2004.10.041
39. Weleber RG. Fast and slow oscillations of the electro-oculogram in Best's macular dystrophy and retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(4):530–7.
40. Wabbels, B. K., Demmler, A., Preising, M. and Lorenz, B. Fundus autofluorescence in patients with genetically determined Best vitelliform macular dystrophy: evaluation of genotype-phenotype correlation and longitudinal course. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, e-abstract 1762; 2004.
41. Best F. II. Über eine hereditäre Maculaaffektion. *Ophthalmologica.* 1905;13(3):199–212. doi:10.1159/000290318
42. Marquardt A, Stöhr H, Passmore LA, Krämer F, Rivera A, Weber BH. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet.* 1998;7(9):1517–25.
43. Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, Sandgren O, Forsman K, Holmgren G, Andreasson S, Vujic M, Bergen AA, McGarty-Dugan V, Figueroa D,

- Austin CP, Metzker ML, Caskey CT, Wadelius C. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet.* 1998;19(3):241–7. doi:10.1038/915
44. Clemett R. Vitelliform dystrophy: long-term observations on New Zealand pedigrees. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology.* 1991;19(3):221–7. doi:10.1111/j.1442-9071.1991.tb00665.x
45. Wabbels B, Preising MN, Kretschmann U, Demmler A, Lorenz B. Genotype-phenotype correlation and longitudinal course in ten families with Best vitelliform macular dystrophy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244(11):1453–66. doi:10.1007/s00417-006-0286-6
46. Mohler CW, Fine SL. Long-term evaluation of patients with Best's vitelliform dystrophy. *Ophthalmology.* 1981;88(7):688–92.
47. Bakall B, Radu RA, Stanton JB, Burke JM, McKay BS, Wadelius C, Mullins RF, Stone EM, Travis GH, Marmorstein AD. Enhanced accumulation of A2E in individuals homozygous or heterozygous for mutations in BEST1 (VMD2). *Exp Eye Res.* 2007;85(1):34–43. doi:10.1016/j.exer.2007.02.018
48. Weingeist TA, Kobrin JL, Watzke RC. Histopathology of Best's macular dystrophy. *Arch Ophthalmol.* 1982;100(7):1108–14.
49. Gass JDM. *Stereoscopic atlas of macular diseases: Diagnosis and treatment.* St. Louis: Mosby; 1987. eng.
50. Nordström S, Thorburn W. Dominantly inherited macular degeneration (Best's disease) in a homozygous father with 11 children. *Clin Genet.* 1980;18(3):211–6.
51. Querques G, Atmani K, Bouzitou-Mfoumou R, Leveziel N, Massamba N, Souied EH. Preferential hyperacuity perimeter in best vitelliform macular dystrophy. *Retina (Philadelphia, Pa).* 2011;31(5):959–66. doi:10.1097/IAE.0b013e3181f441c1
52. Arora R, Khan K, Kasilian ML, Strauss RW, Holder GE, Robson AG, Thompson DA, Moore AT, Michaelides M. Unilateral BEST1-Associated Retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2016;169:24–32. doi:10.1016/j.ajo.2016.05.024
53. Kovach JL, Schwartz SG, Hickey M, McKeown CA. Best's Disease in a 20-Month-Old Child. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2009. doi:10.3928/01913913-20090818-05

54. Pollack K, Kreuz FR, Pillunat LE. Morbus Best mit normalem EOG. Fallvorstellung einer familiären Makuladystrophie [Best's disease with normal EOG. Case report of familial macular dystrophy]. *Der Ophthalmologe*. 2005;102(9):891–4. ger.
doi:10.1007/s00347-004-1088-z
55. Schulz HL. BEST1-Database des Instituts für Humangenetik, Universität Regensburg, aktuellster Stand 27.05.2013.
56. Yardley J, Leroy BP, Hart-Holden N, Lafaut BA, Loeys B, Messiaen LM, Perveen R, Reddy MA, Bhattacharya SS, Traboulsi E, Baralle D, Laey J-J de, Puech B, Kestelyn P, Moore AT, Manson FDC, Black GCM. Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathy (ADVIRC). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(10):3683–9. doi:10.1167/iovs.04-0550
57. Burgess R, Millar ID, Leroy BP, Urquhart JE, Fearon IM, Baere E de, Brown PD, Robson AG, Wright GA, Kestelyn P, Holder GE, Webster AR, Manson FDC, Black GCM. Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *Am J Hum Genet*. 2008;82(1):19–31. doi:10.1016/j.ajhg.2007.08.004
58. Allikmets R, Seddon JM, Bernstein PS, Hutchinson A, Atkinson A, Sharma S, Gerrard B, Li W, Metzker ML, Wadelius C, Caskey CT, Dean M, Petrukhin K. Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies. *Human Genetics*. 1999;104(6):449–53. doi:10.1007/s004390050986
59. Krämer F, White K, Pauleikhoff D, Gehrig A, Passmore L, Rivera A, Rudolph G, Kellner U, Andrassi M, Lorenz B, Rohrschneider K, Blankenagel A, Jurklies B, Schilling H, Schütt F, Holz FG, Weber BH. Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet*. 2000;8(4):286–92. doi:10.1038/sj.ejhg.5200447
60. Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, Burgess-Mullan R, Shweikh Y, Parry N, O'Sullivan J, Maher GJ, McKibbin M, Downes SM, Lotery AJ, Jacobson SG, Brown PD, Black GCM, Manson FDC. Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*. 2009;85(5):581–92. doi:10.1016/j.ajhg.2009.09.015

61. Marmorstein AD, Marmorstein LY, Rayborn M, Wang X, Hollyfield JG, Petrukhin K. 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*. 2000;97(23):12758–63. doi:10.1073/pnas.220402097
62. Fischmeister R, Hartzell HC. Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels. *J Physiol (Lond)*. 2005;562(Pt 2):477–91. doi:10.1113/jphysiol.2004.075622
63. Hartzell C, Qu Z, Putzier I, Artinian L, Chien L-T, Cui Y. Looking chloride channels straight in the eye: bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20292–302. doi:10.1152/physiol.00021.2005
64. Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien L-T. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol Rev*. 2008;88(2):639–72. doi:10.1152/physrev.00022.2007
65. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*. 2002;82(2):503–68. doi:10.1152/physrev.00029.2001
66. Milenkovic VM, Soria RB, Aldehni F, Schreiber R, Kunzelmann K. Functional assembly and purinergic activation of bestrophins. *Pflugers Arch*. 2009;458(2):431–41. doi:10.1007/s00424-008-0626-y
67. O’Driscoll KE, Leblanc N, Hatton WJ, Britton FC. Functional properties of murine bestrophin 1 channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(4):476–81. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.008
68. Qu Z, Fischmeister R, Hartzell C. Mouse bestrophin-2 is a bona fide Cl(-) channel: identification of a residue important in anion binding and conduction. *J Gen Physiol*. 2004;123(4):327–40. doi:10.1085/jgp.200409031
69. Sun H, Tsunenari T, Yau K-W, Nathans J. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):4008–13. doi:10.1073/pnas.052692999
70. Marmorstein AD, Kinnick TR, Stanton JB, Johnson AA, Lynch RM, Marmorstein LY. Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis*. 2015;21347–59.

71. Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, Jendryke T, Sirianant L, Wanitchakool P, Zimmermann S, Reiff CM, Horling F, Schrewe H, Schreiber R, Kunzelmann K, Wetzel CH, Weber BHF. Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(20):E2630-9. doi:10.1073/pnas.1418840112
72. Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, Gamm DM. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2013;22(3):593–607. doi:10.1093/hmg/dds469
73. Barro Soria R, Spitzner M, Schreiber R, Kunzelmann K. Bestrophin-1 enables Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in epithelia. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29405–12. doi:10.1074/jbc.M605716200
74. Barro-Soria R, Aldehni F, Almaça J, Witzgall R, Schreiber R, Kunzelmann K. ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel. *Pflugers Arch*. 2010;459(3):485–97. doi:10.1007/s00424-009-0745-0
75. Marmorstein AD, Cross HE, Peachey NS. Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(3):206–26. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.04.004
76. Neussert R, Müller C, Milenkovic VM, Strauss O. The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER. *Pflugers Arch*. 2010;460(1):163–75. doi:10.1007/s00424-010-0840-2
77. Rosenthal R, Bakall B, Kinnick T, Peachey N, Wimmers S, Wadelius C, Marmorstein A, Strauss O. Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *FASEB J*. 2006;20(1):178–80. doi:10.1096/fj.05-4495fje
78. Zhang Y, Stanton JB, Wu J, Yu K, Hartzell HC, Peachey NS, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease. *Hum Mol Genet*. 2010;19(6):1108–18. doi:10.1093/hmg/ddp583

79. Yu K, Xiao Q, Cui G, Lee A, Hartzell HC. The best disease-linked Cl⁻ channel hBest1 regulates Ca²⁺ V₁ (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains. *J Neurosci*. 2008;28(22):5660–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.0065-08.2008
80. Hall MO, Prieto AL, Obin MS, Abrams TA, Burgess BL, Heeb MJ, Agnew BJ. Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp Eye Res*. 2001;73(4):509–20. doi:10.1006/exer.2001.1062
81. Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA. Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;81(5):581–91. doi:10.1016/j.exer.2005.03.017
82. Karl MO, Kroeger W, Wimmers S, Milenkovic VM, Valtink M, Engelmann K, Strauss O. Endogenous Gas6 and Ca²⁺-channel activation modulate phagocytosis by retinal pigment epithelium. *Cell Signal*. 2008;20(6):1159–68. doi:10.1016/j.cellsig.2008.02.005
83. Wimmers S, Karl MO, Strauss O. Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26(3):263–301. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.12.002
84. Ueda Y, Steinberg RH. Dihydropyridine-sensitive calcium currents in freshly isolated human and monkey retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(2):373–80.
85. Strauss O, Buss F, Rosenthal R, Fischer D, Mergler S, Stumpff F, Thieme H. Activation of neuroendocrine L-type channels (alpha1D subunits) in retinal pigment epithelial cells and brain neurons by pp60(c-src). *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(3):806–10. doi:10.1006/bbrc.2000.2513
86. Rosenthal R, Heimann H, Agostini H, Martin G, Hansen LL, Strauss O. Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Mol Vis*. 2007;13:443–56.
87. Müller C, Más Gómez N, Ruth P, Strauss O. Ca_v1.3 L-type channels, maxiK Ca(2+)-dependent K(+) channels and bestrophin-1 regulate rhythmic photoreceptor outer segment phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *Cell Signal*. 2014;26(5):968–78. doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.021

88. Gómez NM, Tamm ER, Strauß O. Role of bestrophin-1 in store-operated calcium entry in retinal pigment epithelium. *Pflugers Arch.* 2013;465(4):481–95. doi:10.1007/s00424-012-1181-0
89. Cordeiro S, Strauss O. Expression of Orai genes and I(CRAC) activation in the human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(1):47–54. doi:10.1007/s00417-010-1445-3
90. Cordeiro S, Seyler S, Stindl J, Milenkovic VM, Strauss O. Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(11):6001–8. doi:10.1167/iovs.09-4720
91. Barro-Soria R, Stindl J, Müller C, Foeckler R, Todorov V, Castrop H, Strauß O. Angiotensin-2-mediated Ca²⁺ signaling in the retinal pigment epithelium: role of angiotensin-receptor-associated-protein and TRPV2 channel. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e49624. doi:10.1371/journal.pone.0049624
92. Wimmers S, Strauss O. Basal calcium entry in retinal pigment epithelial cells is mediated by TRPC channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(12):5767–72. doi:10.1167/iovs.07-0412
93. Berridge MJ. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:1–21. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040103.152647
94. Parekh AB, Putney JW. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2005;85(2):757–810. doi:10.1152/physrev.00057.2003
95. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 1997;77(4):901–30. doi:10.1152/physrev.1997.77.4.901
96. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 2007;131(6):1047–58. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
97. Putney JW, Steinckwich-Besançon N, Numaga-Tomita T, Davis FM, Desai PN, D’Agostin DM, Wu S, Bird GS. The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1864(6):900–6. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.028
98. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):690–702. doi:10.1038/nri2152

99. Feske S. CRAC channelopathies. *Pflugers Arch.* 2010;460(2):417–35.
doi:10.1007/s00424-009-0777-5
100. Chen Y-F, Chiu W-T, Chen Y-T, Lin P-Y, Huang H-J, Chou C-Y, Chang H-C, Tang M-J, Shen M-R. Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(37):15225–30. doi:10.1073/pnas.1103315108
101. Davis FM, Azimi I, Faville RA, Peters AA, Jalink K, Putney JW, Goodhill GJ, Thompson EW, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene.* 2014;33(18):2307–16. doi:10.1038/onc.2013.187
102. McAndrew D, Grice DM, Peters AA, Davis FM, Stewart T, Rice M, Smart CE, Brown MA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(3):448–60.
doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0923
103. Motiani RK, Zhang X, Harmon KE, Keller RS, Matrougui K, Bennett JA, Trebak M. Orai3 is an estrogen receptor α -regulated Ca^{2+} channel that promotes tumorigenesis. *FASEB J.* 2013;27(1):63–75. doi:10.1096/fj.12-213801
104. Yang S, Zhang JJ, Huang X-Y. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell.* 2009;15(2):124–34.
doi:10.1016/j.ccr.2008.12.019
105. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S-H, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 2006;441(7090):179–85. doi:10.1038/nature04702
106. Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y-I, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Hum Mol Genet.* 2015;24(3):637–48. doi:10.1093/hmg/ddu477
107. Lewis RS. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature.* 2007;446(7133):284–7. doi:10.1038/nature05637

108. Cheng KT, Liu X, Ong HL, Swaim W, Ambudkar IS. Local Ca^{2+} entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions. *PLoS Biol.* 2011;9(3):e1001025.
doi:10.1371/journal.pbio.1001025
109. Strauss O, Steinhausen K, Mergler S, Stumpff F, Wiederholt M. Involvement of protein tyrosine kinase in the InsP3-induced activation of Ca^{2+} -dependent Cl^- currents in cultured cells of the rat retinal pigment epithelium. *J Membr Biol.* 1999;169(3):141–53.
110. Mergler S, Strauss O. Stimulation of L-type Ca^{2+} channels by increase of intracellular InsP3 in rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2002;74(1):29–40. doi:10.1006/exer.2001.1128
111. Bollimuntha S, Cornatzer E, Singh BB. Plasma membrane localization and function of TRPC1 is dependent on its interaction with beta-tubulin in retinal epithelium cells. *Vis Neurosci.* 2005;22(2):163–70. doi:10.1017/S0952523805222058
112. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):411–25. doi:10.1124/pr.57.4.5
113. Omilusik K, Priatel JJ, Chen X, Wang YT, Xu H, Choi KB, Gopaul R, McIntyre-Smith A, Teh H-S, Tan R, Bech-Hansen NT, Waterfield D, Fedida D, Hunt SV, Jefferies WA. The $\text{Ca}_v1.4$ calcium channel is a critical regulator of T cell receptor signaling and naive T cell homeostasis. *Immunity.* 2011;35(3):349–60. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.011
114. Correll RN, Goonasekera SA, van Berlo JH, Burr AR, Accornero F, Zhang H, Makarewich CA, York AJ, Sargent MA, Chen X, Houser SR, Molkenin JD. STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca^{2+} handling and cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;8738–47. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.07.032
115. Meszaros JG, Karin NJ, Akanbi K, Farach-Carson MC. Down-regulation of L-type Ca^{2+} channel transcript levels by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Osteoblastic cells express L-type $\alpha_1\text{C}$ Ca^{2+} channel isoforms. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32981–5.
116. Hu F, Pan L, Zhang K, Xing F, Wang X, Lee I, Zhang X, Xu J. Elevation of extracellular Ca^{2+} induces store-operated calcium entry via calcium-sensing receptors: a pathway

- contributes to the proliferation of osteoblasts. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e107217. doi:10.1371/journal.pone.0107217
117. Wang Y, Deng X, Mancarella S, Hendron E, Eguchi S, Soboloff J, Tang XD, Gill DL. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*. 2010;330(6000):105–9. doi:10.1126/science.1191086
118. Park CY, Shcheglovitov A, Dolmetsch R. The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*. 2010;330(6000):101–5. doi:10.1126/science.1191027
119. Nohara LL, Stanwood SR, Omilusik KD, Jefferies WA. Tweeters, Woofers and Horns: The Complex Orchestration of Calcium Currents in T Lymphocytes. *Front Immunol*. 2015;6:234. doi:10.3389/fimmu.2015.00234
120. Omilusik KD, Nohara LL, Stanwood S, Jefferies WA. Weft, warp, and weave: the intricate tapestry of calcium channels regulating T lymphocyte function. *Front Immunol*. 2013;4:164. doi:10.3389/fimmu.2013.00164
121. Reichhart N, Milenkovic VM, Halsband C-A, Cordeiro S, Strauss O. Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit. *Exp Eye Res*. 2010;91(5):630–9. doi:10.1016/j.exer.2010.08.001
122. Milenkovic VM, Krejcova S, Reichhart N, Wagner A, Strauss O. Interaction of bestrophin-1 and Ca²⁺ channel β -subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e19364. doi:10.1371/journal.pone.0019364
123. Wimmers S, Coeppicus L, Rosenthal R, Strauss O. Expression profile of voltage-dependent Ca²⁺ channel subunits in the human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(5):685–92. doi:10.1007/s00417-008-0778-7
124. Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, Striessnig J. α 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J Biol Chem*. 2001;276(25):22100–6. doi:10.1074/jbc.M101469200
125. Engel J, Michna M, Platzer J, Striessnig J. Calcium channels in mouse hair cells: function, properties and pharmacology. *Adv Otorhinolaryngol*. 2002;59:35–41.

126. Michna M, Knirsch M, Hoda J-C, Muenkner S, Langer P, Platzer J, Striessnig J, Engel J. Cav1.3 (alpha1D) Ca²⁺ currents in neonatal outer hair cells of mice. *J Physiol (Lond)*. 2003;553(Pt 3):747–58. doi:10.1113/jphysiol.2003.053256
127. Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell*. 2000;102(1):89–97.
128. Genewsky A, Jost I, Busch C, Huber C, Stindl J, Skerka C, Zipfel PF, Rohrer B, Strauß O. Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflugers Arch*. 2015;467(10):2179–91. doi:10.1007/s00424-014-1656-2
129. Franckowiak G, Bechem M, Schramm M, Thomas G. The optical isomers of the 1,4-dihydropyridine BAY K 8644 show opposite effects on Ca channels. *Eur J Pharmacol*. 1985;114(2):223–6.
130. Bellemann P, Franckowiak G. Different receptor affinities of the enantiomers of BAY K 8644, a dihydropyridine Ca channel activator. *Eur J Pharmacol*. 1985;118(1-2):187–8.
131. Hof RP, Rüegg UT, Hof A, Vogel A. Stereoselectivity at the calcium channel: opposite action of the enantiomers of a 1,4-dihydropyridine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985;7(4):689–93.
132. Kass RS. Voltage-dependent modulation of cardiac calcium channel current by optical isomers of Bay K 8644: implications for channel gating. *Circ Res*. 1987;61(4 Pt 2):11-5.
133. Wei XY, Luchowski EM, Rutledge A, Su CM, Triggle DJ. Pharmacologic and radioligand binding analysis of the actions of 1,4-dihydropyridine activator-antagonist pairs in smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986;239(1):144–53.
134. Bechem M, Hebisch S, Schramm M. Ca²⁺ agonists: new, sensitive probes for Ca²⁺ channels. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1988;9(7):257–61. doi:10.1016/0165-6147(88)90156-3
135. Janis RA, Triggle D. J., editor. Calcium channels: their properties, functions, regulation and clinical relevance: Drugs acting on calcium channels. CRC Press, Boca Raton; 1991. 195–249.

136. Knirsch M, Brandt N, Braig C, Kuhn S, Hirt B, Münkner S, Knipper M, Engel J. Persistence of Ca(v)1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J Neurosci.* 2007;27(24):6442–51. doi:10.1523/JNEUROSCI.5364-06.2007
137. Gomez JP, Fares N, Potreau D. Effects of Bay K 8644 on L-type calcium current from newborn rat cardiomyocytes in primary culture. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(10):2217–29. doi:10.1006/jmcc.1996.0213
138. Hering S, Hughes AD, Timin EN, Bolton TB. Modulation of calcium channels in arterial smooth muscle cells by dihydropyridine enantiomers. *J Gen Physiol.* 1993;101(3):393–410.
139. Markwardt F, Nilius B. Modulation of calcium channel currents in guinea-pig single ventricular heart cells by the dihydropyridine Bay K 8644. *J Physiol (Lond).* 1988;399:559–75.
140. Mironneau J, Yamamoto T, Sayet I, Arnaudeau S, Rakotoarisoa L, Mironneau C. Effect of dihydropyridines on calcium channels in isolated smooth muscle cells from rat vena cava. *Br J Pharmacol.* 1992;105(2):321–8.
141. Sanguinetti MC, Kass RS. Regulation of cardiac calcium channel current and contractile activity by the dihydropyridine Bay K 8644 is voltage-dependent. *J Mol Cell Cardiol.* 1984;16(7):667–70.
142. Sanguinetti MC, Krafte DS, Kass RS. Voltage-dependent modulation of Ca channel current in heart cells by Bay K8644. *J Gen Physiol.* 1986;88(3):369–92.
143. Giansanti V, Rodriguez GEV, Savoldelli M, Gioia R, Forlino A, Mazzini G, Pennati M, Zaffaroni N, Scovassi AI, Torriglia A. Characterization of stress response in human retinal epithelial cells. *J Cell Mol Med.* 2013;17(1):103–15. doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01652.x.
144. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res.* 1996;62(2):155–69. doi:10.1006/exer.1996.0020
145. Davis AA, Bernstein PS, Bok D, Turner J, Nachtigal M, Hunt RC. A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(5):955–64.

146. Gouras P, Braun K, Ivert L, Neuringer M, Mattison JA. Bestrophin detected in the basal membrane of the retinal epithelium and drusen of monkeys with drusenoid maculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(8):1051–6. doi:10.1007/s00417-009-1091-9
147. Mullins RF, Kuehn MH, Faidley EA, Syed NA, Stone EM. Differential macular and peripheral expression of bestrophin in human eyes and its implication for best disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(7):3372–80. doi:10.1167/iovs.06-0868
148. Guziewicz KE, Zangerl B, Lindauer SJ, Mullins RF, Sandmeyer LS, Grahn BH, Stone EM, Acland GM, Aguirre GD. Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(5):1959–67. doi:10.1167/iovs.06-1374
149. Mullins RF, Oh KT, Heffron E, Hageman GS, Stone EM. Late development of vitelliform lesions and flecks in a patient with best disease: clinicopathologic correlation. *Arch Ophthalmol*. 2005;123(11):1588–94. doi:10.1001/archopht.123.11.1588
150. Milenkovic VM, Röhrl E, Weber BHF, Strauss O. Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 17):2988–96. doi:10.1242/jcs.085878
151. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440–50.
152. Lisenbee CS, Karnik SK, Trelease RN. Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic*. 2003;4(7):491–501.
153. Clapham DE. The list of potential volume-sensitive chloride currents continues to swell (and shrink). *J Gen Physiol*. 1998;111(5):623–4.
154. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(1):11–21. doi:10.1038/35036035
155. Boulton ME. Studying melanin and lipofuscin in RPE cell culture models. *Exp Eye Res*. 2014;12661–7. doi:10.1016/j.exer.2014.01.016
156. Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Müsch A. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(3):233–47. doi:10.1038/nrm1593

157. Johnson AA, Lee Y-S, Stanton JB, Yu K, Hartzell CH, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. *Hum Mol Genet.* 2013;22(23):4688–97. doi:10.1093/hmg/ddt316
158. Marmorstein AD, Stanton JB, Yocom J, Bakall B, Schiavone MT, Wadelius C, Marmorstein LY, Peachey NS. A model of best vitelliform macular dystrophy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(10):3733–9. doi:10.1167/iovs.04-0307
159. Dalvin LA, Johnson AA, Pulido JS, Dhaliwal R, Marmorstein AD. Nonantibestrophin Anti-RPE Antibodies in Paraneoplastic Exudative Polymorphous Vitelliform Maculopathy. *Transl Vis Sci Technol.* 2015;4(3):2. doi:10.1167/tvst.4.3.2
160. Marmorstein LY, Wu J, McLaughlin P, Yocom J, Karl MO, Neussert R, Wimmers S, Stanton JB, Gregg RG, Strauss O, Peachey NS, Marmorstein AD. The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1). *J Gen Physiol.* 2006;127(5):577–89. doi:10.1085/jgp.200509473
161. Guziewicz KE, Zangerl B, Komáromy AM, Iwabe S, Chiodo VA, Boye SL, Hauswirth WW, Beltran WA, Aguirre GD. Recombinant AAV-mediated BEST1 transfer to the retinal pigment epithelium: analysis of serotype-dependent retinal effects. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e75666. doi:10.1371/journal.pone.0075666
162. Brandl C, Zimmermann SJ, Milenkovic VM, Rosendahl SMG, Grassmann F, Milenkovic A, Hehr U, Federlin M, Wetzelschneider CH, Helbig H, Weber BHF. In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). *Neuromolecular Med.* 2014;16(3):551–64. doi:10.1007/s12017-014-8308-8
163. Johnson AA, Bachman LA, Gilles BJ, Cross SD, Stelzig KE, Resch ZT, Marmorstein LY, Pulido JS, Marmorstein AD. Autosomal Recessive Bestrophinopathy Is Not Associated With the Loss of Bestrophin-1 Anion Channel Function in a Patient With a Novel BEST1 Mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(8):4619–30. doi:10.1167/iovs.15-16910
164. Davidson AE, Millar ID, Burgess-Mullan R, Maher GJ, Urquhart JE, Brown PD, Black GCM, Manson FDC. Functional characterization of bestrophin-1 missense mutations

associated with autosomal recessive bestrophinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(6):3730–6. doi:10.1167/iovs.10-6707

165. Johnson AA, Lee Y-S, Chadburn AJ, Tammaro P, Manson FD, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1. Exp Eye Res. 2014;12174–85. doi:10.1016/j.exer.2014.02.006

9 Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calcium-Konzentration
ABP	Aminoethoxydiphenylborat
ADVIRC	Autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrom</i>
ARB	Autosomal-rezessive Bestrophinopathie
ARPE-19	<i>adult retinal pigment epithelium-19</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AVMD	Adulte vitelliforme Makuladystrophie
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTP	3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazol
Ca ²⁺	Calcium
Ca _v	alpha ₁ -Untereinheit des L-Typ-Calcium-Kanals (<i>voltage-dependent</i>)
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRAC	<i>calcium release-activated calcium</i>
dest.	destillata
DHP	Dihydropyridin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Elongationsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetat
EOG	Elektrookulogramm

ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
fhRPE	<i>fetal human retinal pigment epithelium</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
I _{Ba}	Barium-Einwärtsstrom
I _{CRAC}	<i>calcium release-activated calcium current</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LTCC	<i>L-type calcium channel</i> (L-Typ-Calcium-Kanal)
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i>
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
P	Passage
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEDF	<i>pigment epithelium derived factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PM	Plasmamembran
RP	Retinopathia pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
SERCA	<i>sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPase</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SOC	<i>super optimal catabolite repression</i>
SOCE	<i>store-operated calcium entry</i> (speicherabhängiger Calcium-Einstrom)
STIM	<i>stromal interacting molecule</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC	<i>transient receptor potential canonical</i>
TRPV	<i>transient receptor potential vanilloid</i>
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VMD	Vitelliforme Makuladystrophie
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZO	<i>zonula occludens</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

10 Danksagung

DANKE an Prof. Dr. Olaf Strauß für die Betreuung dieser Arbeit und die wertvollen Gespräche und Treffen der letzten Jahre. An Renate Föckler für die großartige Unterstützung bei den Klonierungsarbeiten, an Elfriede Eckert und Andrea Dannullis für die hilfreichen Ratschläge sowie an das gesamte Team für die Zusammenarbeit, insbesondere an Claudia Müller, Néstor Más Gómez und René Barro Soria für die gemeinsamen Stunden im Labor und außerhalb des Labors. An Herrn Florian Zeman für die Beratung bei statistischen Fragen und an Frau Elena Bayreuther für die spontane und freundliche Einführung in Citavi.

DANKE an Jonas Telorac für die buchstäblich unermüdliche Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit und an Nina und Michael Weber für ihren scharfen Blick und die konstruktive Kritik.

DANKE an meine liebe Familie auf der einen wie auch auf der anderen Seite des Brenners, für die selbstlose Unterstützung und Geduld meiner Eltern und die motivierende Zielstrebigkeit meines Bruders Josef. Ganz besonderen Dank an meinen in diesem Jahr verstorbenen Großvater Günter, dem ich diese Arbeit widmen möchte.

DANKE an alle meine Freunde für das Beistehen in schwierigen Zeiten, besonders an Daniel Zacher für die bedingungslose aufbauende Unterstützung und Motivation.

Schließlich DANKE an Prof. Dr. Horst Helbig für den letzten entscheidenden „Anstoß“ zur Vollendung dieser Arbeit.

11 Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Isabel Wilma Bachmeier
Geburtsdaten: 03.02.1988 in Straubing
Staatsangehörigkeit: deutsch

■ Schulbildung

1998 – 2007 Besuch des Anton-Bruckner-Gymnasiums Straubing
Abschluss Abitur (Durchschnittsnote: 1,0)

■ Medizinische Ausbildung

2007 – 2014 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

August 2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
(Durchschnittsnote: 1,5)

April/Mai 2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
(Durchschnittsnote: 2,0)

2010 – 2018 Experimentelle Doktorarbeit in der „Experimentellen Ophthalmologie“ der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Regensburg
Mentor: Prof. Dr. Olaf Strauß
Thema: “Beteiligung spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanäle am speicherabhängigen Calcium-Einstrom in ARPE-19-Zellen: Einfluss von Bestrophin-1 Wildtyp und Mutanten”

■ Praktika, klinische Erfahrung und Auslandserfahrungen während des Studiums

September 2010 & März 2012 je einmonatige Famulatur in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Regensburg

April 2011 zweiwöchige Famulatur in der Kinderchirurgie des Universitätsklinikums „La Paz“ in Madrid, Spanien

September 2011 einmonatige Famulatur in der Neurochirurgie des Universitätsklinikums Lund, Schweden

April 2012 einmonatige Famulatur am Institut für Röntgendiagnostik des Universitätsklinikums Regensburg

