

Entwicklung einer skalierbaren Wirkstoffscreening-Plattform
zur Identifizierung therapeutisch einsetzbarer Modulatoren
von mutantem Bestrophin-1



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

vorgelegt von
Lisa Marie Johanna Dürr geb. Braun
aus Burglengenfeld

im Jahr 2020

Teile dieser Arbeit sind Gegenstand des Patentvorhabens
BayPat: B79178

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Bernhard H.F. Weber

Lisa Marie Johanna Dürr

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3

1 Einleitung	6
1.1 Innovative Ansätze der Therapieforschung	6
1.1.1 Gentherapie	6
1.1.2 Arzneimittel-Screening im Hochdurchsatz	7
1.2 Seltene Erkrankungen – Die Weisen der Wissenschaft	8
1.3 Das Auge – Die ideale Umgebung für Therapieforschung	9
1.4 Morbus Best (M. Best) – Eine noch nicht therapierte, seltene Retinopathie	11
1.4.1 Phänotyp und Diagnostik	11
1.4.2 Klinisches Spektrum der Bestrophinopathien	13
1.4.3 Expression, Funktion und Struktur von Bestrophin-1 (BEST1)	14
1.4.4 Molekulare Pathomechanismen	15
1.5 Konzepte zur Therapie der Bestrophinopathien	16
1.5.1 Gentherapie	17
1.5.2 Arzneimittel-Screening im Hochdurchsatz	17
1.6 Ziel der Arbeit – Entwicklung einer Hochdurchsatz-Screening (HTS)-Plattform zur Wirkstoffentdeckung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Reagenzien und Chemikalien	20
2.2 Wirkstoffkollektionen	21
2.3 Generierung und Kultivierung von <i>BEST1</i> -exprimierenden Zellsystemen	21
2.3.1 Generierung von stabil <i>BEST1</i> -exprimierenden <i>Madin Darby Canine Kidney</i> (MDCKII)-Zelllinien	21
2.3.2 Kultivierung von stabil <i>BEST1</i> exprimierenden MDCKII-Zelllinien	23
2.3.3 Generierung von humanen induzierten retinalen Pigmentepithel (hiRPE)-Zelllinien	23
2.3.4 Kultivierung von hiRPE-Zelllinien	26
2.4 Generierung des <i>BEST1</i> -3D-Strukturmodells	26
2.5 RNA-Isolierung, Reverse Transkription (RT) und Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	26
2.6 Proteinprobenvorbereitung, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot-Analyse	27
2.7 Immunozytochemische Färbungen	29
2.8 Halogenidtransport-Assay	30
2.9 Patch-Clamp-Setup	31

2.10	Photorezeptor-Außensegment (POS)-Degradations-Assay	33
2.11	Biopartikel-Phagozytose-Assay	34
2.12	Zellvolumen-Messungen	34
2.13	Roboterautomatisierung des Lokalisations-Assays	35
2.14	Datenanalyse und Graphische Darstellung	37

3 Ergebnisse

38

3.1	Generierung und Charakterisierung von <i>BEST1</i> -exprimierenden Zellsystemen	38
3.1.1	Herstellung von stabil <i>BEST1</i> -exprimierenden MDCKII-Zelllinien	38
3.1.2	Generierung von Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zellkulturlinien	39
3.1.3	Untersuchung der <i>BEST1</i> -Proteinlokalisierung	40
3.1.4	Untersuchung der <i>BEST1</i> -Kanalfunktion	42
3.1.5	Untersuchung der POS-Degradation und Phagozytose-Aktivität	45
3.1.6	Untersuchung der Zellvolumina und Volumenregulation	47
3.2	Entwicklung skalierbarer Wirkstoffscreening-Plattformen	49
3.2.1	Entwicklung einer Lokalisations-Assay-Plattform im 384-Well-Format	49
3.2.2	Entwicklung einer Halogenidtransport-Assay-Plattform im 96-Well-Format	53
3.3	Wirkstoff screenings	56
3.3.1	Screening einer Kollektion von 2.645 Wirkstoffen mittels Lokalisations-Assay-Plattform und Validierung der Wirksamkeit potentieller <i>BEST1</i> -Korrektoren	56
3.3.2	Screening einer Kollektion von 2.560 Wirkstoffen mittels Halogenidtransport-Assay-Plattform und Validierung der Wirksamkeit potentieller <i>BEST1</i> -Potentiatoren	59
3.4	Validierung der biologischen Aktivität des Wirkstoffkandidaten <i>Selng</i> in hiRPE	63

4 Diskussion

65

4.1	Charakterisierung der <i>BEST1</i> -Zellsysteme	66
4.1.1	Pathogene <i>BEST1</i> -Varianten fehllokalisieren	66
4.1.2	Pathogene <i>BEST1</i> -Varianten zeigen verringerte Kanalfunktion	68
4.1.3	M. Best-assoziierte hiRPE-Zellen zeigten erhöhten lysosomalen pH-Wert infolge von Biopartikel-Phagozytose	69
4.1.4	Tendenz zum erhöhten Zellvolumen in M. Best-hiRPE	71
4.2	Lokalisations-Assay dient als effiziente Screening-Plattform	72
4.3	Halogenidtransport-Assay dient als effiziente Screening-Plattform	73
4.4	Ausblick	74
4.5	Fazit	75

Anhang: Installation und Etablierung eines Instituts-eigenen <i>Patch-Clamp-Setups</i>	77
Abkürzungsverzeichnis	81
Tabellenverzeichnis	82
Abbildungsverzeichnis	83
Literaturverzeichnis	85
Danksagung	95

Zusammenfassung

Humanes Bestrophin-1 (BEST1) ist ein Chloridkanal, der in der basolateralen Membran des retinalen Pigmentepithels lokalisiert ist. Dieser Kanal wird durch Veränderungen der Kalziumkonzentration und des Zellvolumens reguliert. Genetische Veränderungen in dem dafür kodierenden Gen (*BEST1*) können zu degenerativen Netzhauterkrankungen führen, wobei sich mehrere distinkte Krankheitsbilder, wie Morbus Best (M. Best), auch bekannt als Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD) sowie die autosomal-dominante vitelliforme Makuladystrophie (AVMD), die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) und die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (ARB) unterscheiden lassen. Bis heute steht für keine dieser Erkrankungen eine Therapie zur Verfügung. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, Hochdurchsatz-geeignete Screening-Plattformen für die Suche nach BEST1-Modulatoren zu entwickeln, welche die Funktion des mutanten BEST1 wiederherstellen und sich somit potentiell zur M. Best-Therapie eignen.

Initiale Aufgabe war es, belastbare *BEST1*-exprimierende Zellkulturmodelle zu generieren. Eine stabile transgene *BEST1*-Expression, wildtypisch und mutant, wurde im polaren *Madin Darby Canine Kidney II* (MDCKII)-Zellsystem erreicht. Zusätzlich wurde ein Patienten-abgeleitetes Zellmodell von retinalen Pigmentepithelzellen (hiRPE) aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) generiert.

Ein Zellkulturrepositorium wurde für fünf patientenabgeleitete Zelllinien mit nachgewiesenen pathologischen Mutationen im *BEST1* etabliert und phänotypisch charakterisiert. Dabei wurden klare und robuste Unterschiede zwischen wildtypischem und mutantem *BEST1* bezüglich Lokalisation und Kanalfunktion festgestellt. Immunozytochemische Färbungen zeigten eine klare Fehllokalisierung einiger M. Best-assozierter *BEST1*-Varianten in hiRPE- und MDCKII-Zelllinien. Außerdem wurde bei allen *BEST1*-Mutationen anhand eines Biosensor-basierten Halogenidtransport-Assays eine eindeutige Beeinträchtigung der Kanalfunktion beobachtet. Die verringerte Anionenleitfähigkeit des mutierten *BEST1* wurde mittels eigens im Rahmen dieser Arbeit am Institut etablierten *Patch-Clamp*-Systems in *Whole-Cell*-Messungen bestätigt.

Die Detektion der BEST1-Lokalisation (Lokalisations-Assay) und die Messung der BEST1-Kanalfunktion (Halogenidtransport-Assay) konnten als Messparameter für Hochdurchsatz-Screenings (HTS) im 384- bzw. 96-Well-Format genutzt werden. Somit konnten Roboterautomation-gestützte Pipelines etabliert und die Wirksamkeit von jeweils ca. 2.500 Wirkstoffen getestet werden.

Durch den Lokalisations-Assay wurden 72 Wirkstoffe als Treffer im primären Screen detektiert, wobei 37 Wirkstoffe tatsächlich zur Korrektur der Lokalisation des mutierten BEST1 führten. Durch den Halogenidtransport-Assay wurden 98 Treffer im initialen Screening detektiert. In den weiteren Screening-Schritten wurde der Wirkstoff mit dem Codenamen „The Secret Ingredient“ (*Selng*) als vielversprechender *Potentiator* aufgedeckt, der die BEST1-Kanalfunktion des mutanten BEST1 wiederherstellte. Dessen positiver Effekt auf die Anionenpermeabilität zeigte sich als robust replizierbar, spezifisch, konzentrationsabhängig und stabil für mehrere unterschiedliche pathogene BEST1-Varianten. Die Wirksamkeit von *Selng* wurde auch durch direkte Anionenstrom-Messungen am *Patch-Clamp*-System in hiRPE verifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Zellkulturmodellen klare phänotypische Unterschiede bzgl. Lokalisation und Kanalfunktion zwischen normalem BEST1 und M. Best-assoziierten BEST1-Mutanten detektiert. Um nach *Korrektoren* der Lokalisation und *Potentiatoren* der Kanalfunktion des mutierten BEST1 zu suchen, wurde die Detektion dieser Merkmale auf HTS-geeignete Formate übertragen. Durch die beiden neu entwickelten Screening-Plattformen war es möglich, potentiell therapeutisch einsetzbare BEST1-Modulatoren zu identifizieren.

Summary

Human Bestrophin-1 (BEST1) is a chloride channel localized at the basolateral membrane of the retinal pigment epithelium (RPE) which can be triggered via fluctuations in calcium levels and cell volume. Mutations in the protein-coding gene *BEST1* result in degenerative retinal diseases whereby several distinct clinical phenotypes can be distinguished such as Best disease (BD), also known as Best vitelliform macular dystrophy (BVMD) as well as the autosomal dominant vitelliform macular dystrophy (AVMD), the autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC) and the autosomal recessive bestrophinopathy (ARB). Today, no therapy is available to treat these disorders. The efforts of this study are directed towards developing high-throughput drug screening platforms to search for BEST1 modulators, which restore mutant BEST1 function with the potency to treat BD.

The initial task was to generate robust *BEST1* expressing cell culture models. Stable transgenic wildtype and mutant *BEST1* expression was achieved in the polar *Madin Darby Canine Kidney II* (MDCKII) cell system. In addition, a patient-derived cell model of retinal pigment epithelial cells (hiRPE) was generated from human induced pluripotent stem cells (hiPSC).

A cell culture repository was established and phenotypically characterized for five patient-derived cell lines with confirmed pathological *BEST1* mutations. Clear and robust differences in localization and channel function between wildtype and mutant *BEST1* were detected. Immunocytochemical staining demonstrated a clear mislocalization of some M. Best-associated *BEST1* variants in hiRPE and MDCKII cell lines. A biosensor-based halide transport assay revealed diminished channel function in all *BEST1* mutants. The reduced anion permeability of the mutated *BEST1* was further confirmed in *whole-cell patch-clamp* recordings, especially established as part of this work at the institute.

The detection of *BEST1* localization (localization assay) and the measurement of *BEST1* channel function (halide transport assay) could be transferred as measuring parameters in high-throughput screenings (HTS) in 384- or 96-well formats. This enabled the establishment of robotic process automation pipelines and the performance of drug screenings of approximately 2,500 active substances.

The localization assay detected 72 hits in the primary screen with 37 active substances actually leading to the correction of mutant BEST1 localization. The halide transport assay detected 98 hits in its initial screening. In additional screening steps, the compound with the code name "The Secret Ingredient" (*Se/ng*) was identified as a promising *potentiator* that restored mutant BEST1 channel function. Its positive effect on anion permeability was confirmed to be replicable, specific, concentration-dependent and stable for several different pathogenic BEST1 variants. The efficacy of *Se/ng* was verified by direct anion current measurements via *patch-clamp* recordings in hiRPE.

The present study demonstrates clear phenotypic differences regarding localization and channel function between normal BEST1 and M. Best-associated BEST1 mutants in cell culture models. In order to search for *correctors* for mutant BEST1 localization and *potentiators* to restore mutant BEST1 channel function, the detection of these features was transferred to formats suitable for HTS. The two newly generated screening platforms enabled the identification of BEST1 modulators for potential future M. Best therapy.

1 Einleitung

1.1 Innovative Ansätze der Therapieforschung

Im Fokus der klinischen Forschung steht die Therapie von Erkrankungen. Zu den historischen Meilensteinen der Therapieforschung gehören ohne Zweifel die Entwicklung der ersten Schutzimpfung, die Anwendung der modernen Narkose zur Durchführung von Operationen und die Entdeckung von Antibiotika. Doch auch in den letzten Jahren gab es immer wieder beeindruckende Entwicklungen, welche die Medizin revolutioniert haben. Es eröffneten sich richtungsweisende Wege, Patienten mit bisher nicht therapierbaren Erkrankungen zu behandeln.

1.1.1 Gentherapie

Eine bedeutende Innovation der jüngeren Zeit auf dem Gebiet der Therapieforschung ist fraglos die Gentherapie. Klassischerweise handelt es sich dabei um Generatztherapien. Ein intaktes Gen wird in das Genom von Zielzellen eingefügt, um ein defektes Gen zu ersetzen, welches ursächlich für die Entstehung der Krankheit ist.

2017 wurde die erste Genadditionstherapie, die CAR-T-Zell-Therapie, unter dem Handelsnamen Kymriah® zur Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) durch die Behörde für Lebens- und Arzneimittel der Vereinigten Staaten (*Food and Drug Administration*, FDA) zugelassen. Kymriah® ist eine Kombination aus Zell- und Gentherapie. Dabei werden dem Patienten körpereigene T-Zellen entnommen und im Labor mit dem *chimeric antigen receptor* (CAR) ausgestattet (Maude et al., 2015). Fast zeitgleich erreichte der erste direkt in den Patienten applizierte Gentherapie-Wirkstoff Luxturna™ Marktreife. Der FDA-Zulassung 2017 gingen klinische Studien voraus, die Wirkung und Sicherheit in der Behandlung der erblich bedingten Netzhautdystrophie Lebersche kongenitale Amaurose (*Leber's congenital amaurosis*, LCA) bestätigten (Maguire et al. 2008, Maguire et al 2009, Simonelli et al 2010; Ashtari et al., 2011; Russell et al. 2017, Bennet et al., 2018). Bis zum heutigen Tage wurden durch die FDA sechs gentherapeutische Wirkstoffe zugelassen (www.fda.gov; abgerufen März 2020), die neben ALL (Kymriah® und Yescarta®; Maude et al., 2015; Neelapu et al., 2017) und LCA (Luxturna®, Bennet

et al., 2018) die Erkrankungen der spinalen Muskelatrophie (Zolgensma®, Al-Zaidy et al., 2019), das malignes Melanom (Imlytic®, Andtbacka et al., 2015) und hormonrefraktären Prostatakrebs (Provenge®, Small et al., 2006) adressieren.

Eine neue Dimension der Gentherapie wurde durch die Genomeditierung erreicht, wodurch schnell, präzise und kostengünstig Veränderungen in der DNA-Sequenz von Patientenzellen vorgenommen werden können. Die vorwiegend angewandte Methode basiert auf dem *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / Cas-Protein 9* (CRISPR/Cas) -System. Dabei wird eine Sequenz aus 20 Nukleotiden designt, die als *Single-Guide-RNA* (sgRNA) spezifisch an eine DNA-Sequenz bindet. Die sgRNA rekrutiert die Nuklease Cas9, welche die DNA schneidet. Es ist dadurch möglich, gezielt von einer Mutation betroffene Allelbereiche zu targetieren und zu entfernen. Bei monoallelischen Mutationsträgern kann so der wildtypische DNA-Strang unversehrt bleiben. CRISPR/Cas9 stellt demnach besonders für dominant vererbte Erkrankungen einen Therapieansatz mit großem Potential dar. Im September 2018 startete die erste klinische Studie einer CRISPR/Cas-basierten Gentherapie zur Behandlung von Beta-Thalassämie unter anderem in Regensburg (Registernummer unter ClinicalTrials.gov: NCT03655678). In der Entwicklung sind CRISPR/Cas-basierte Therapien derzeit auch für die Behandlung von Sichelzellanämie (DeWitt et al., 2016), Hämophilie A (George et al., 2017), X-chromosomal-rezessiver septischer Granulomatose (Ravin et al., 2017) und für die Retinopathie LCA Typ 10 (Maeder et al., 2019).

1.1.2 Arzneimittel-Screening im Hochdurchsatz

Die meisten täglich eingesetzten Arzneimittel stammen aus der Gruppe der niedermolekularen Substanzen. Historisch wurden die meisten Medikamente auf der Basis von Naturstoffen mit bekannter Wirkung entwickelt oder zufällig entdeckt. Mit der Entwicklung molekulargenetischer Methoden und spätestens mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms hat sich ein Paradigmenwechsel in der Wirkstoffforschung vollzogen. Durch die Identifizierung pathologischer Ursachen auf molekularer Ebene war es nun möglich, spezifische Proteine als zelluläre Funktionsträger zu erkennen und nach ihren Modulatoren zu suchen.

Dabei wurden die Analytik und Labortechnik von entscheidenden wissenschaftlichen und technologischen Entwicklungen geprägt. Die Mehrheit der modernen Arzneimittel wurde durch umfangreiche Tests möglicher Wirkstoffe in Hochdurchsatz-Screenings (*high-throughput-screening*, HTS) entdeckt. HTS erlauben durch die robotergestützte und vollautomatische Untersuchung tausender Wirkstoffkandidaten völlig neue zeitliche Dimensionen bei der Suche nach neuen Medikamenten. Man ist heute in der Lage, Tausende von Molekülaktivitäten innerhalb kürzester Zeit vollautomatisch zu analysieren. Derzeitige HTS-Systeme arbeiten mit einem Durchsatz von mindestens 10.000 Proben am Tag, die so genannten Ultra-HTS-Systeme können gar 100.000 bis 200.000 Substanzen täglich messen. Eines der vielen Beispiele für den Erfolg von HTS ist die Wirkstoffentwicklung zur Behandlung der genetisch bedingten Stoffwechselerkrankung Mukoviszidose. Kenntnisse der Pathomechanismen der Mukoviszidose auf zellulärer Ebene bildeten die Basis für die Entwicklung von HTS-Pipelines. Mit deren Hilfe wurden effektive Wirkstoffe entdeckt (van Goor et al. 2009; van Goor et al., 2011), die in klinischen Studien bestätigt und zur Behandlung zugelassen wurden (Wainwright et al., 2015; Graeber et al., 2018).

1.2 Seltene Erkrankungen – Die Weisen der Wissenschaft

Trotz der Fortschritte in der klinischen Forschung stehen bis heute weltweit nur etwa einem Drittel der insgesamt 30.000 bekannten Erkrankungen Therapiemöglichkeiten gegenüber. Gerade seltene Erkrankungen gelten als „Weisenkinder“ der Wissenschaft, denn deren Erforschung und die medizinische Versorgung der Patienten ist aufgrund ihrer Seltenheit aus medizinischen und ökonomischen Gründen erschwert. Dabei sind seltene Krankheiten in den meisten Fällen schwerwiegende und chronisch verlaufende Erkrankungen, die häufig mit einer eingeschränkten Lebensqualität und/oder eingeschränkten Lebenserwartung einhergehen (*European Organisation for Rare Diseases*, EURORDIS, 2005). Als selten wird eine Erkrankung in der EU eingestuft, wenn eine Prävalenz von 5 von 10.000 oder geringer vorliegt (Verordnung (EG) Nr. 141/2000, Präambel Abs. 5). Dabei treten die Erkrankungen für sich genommen selten auf, jedoch sind ca. 7.000 bis 8.000 individuelle seltene Erkrankungen beschrieben (Bundesministerium für Gesundheit, 2009). Allein in Deutschland sind

schätzungsweise etwa vier Millionen Menschen von einer seltenen Erkrankung betroffen (Bundesministerium für Gesundheit, 2009). Seit dem Jahr 2000 unterstützt das Europäische Parlament gezielt die Erforschung und Entwicklung von Medikamenten für seltene Erkrankungen, sogenannten *Orphan Drugs*. Der *Orphan Drug*-Status bietet als wirtschaftlichen Anreize für die Pharmaindustrie eine zehnjährige Marktexklusivität unabhängig vom Patentschutz und reduziert bzw. erlässt die Gebühren der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA). Seither wurden in der Folge 158 Wirkstoffe gegen 131 seltene Krankheiten zugelassen und im Jahr 2019 profitierten 16 der 36 Medikamenten-Markteinführungen in Deutschland vom *Orphan Drug*-Status (Gemeinschaftsregister für Arzneimittel für seltene Leiden, 2020).

Vom Verständnis der Ursachen für seltene Erkrankungen profitieren nicht nur die davon betroffenen Patienten. Durch die Erforschung der Ursachen dieser zu ca. 80 % genetisch bedingten Erkrankungen (Wetterauer und Schuster, 2008) können pathologische Folgen einzelner Gendefekte und dadurch Signalwege aufgeklärt werden. Diese Erkenntnisse sind ebenso wertvoll für die Erforschung weitaus häufiger auftretender, komplexer Erkrankungen. Beispielsweise ermöglichte die Aufklärung der genetischen Ursache der seltenen juvenilen Osteoporose grundlegende Erkenntnisse zum Knochenstoffwechsel (Laine et al., 2013). Dies könnte dazu beitragen, unser Wissen für die häufig auftretende altersbedingte Osteoporose zu steigern.

1.3 Das Auge – Die ideale Umgebung für Therapieforschung

In Folge der oben beschriebenen Erfolgsgeschichte der Genadditionstherapie zur Behandlung der LCA (Maguire et al. 2008, Maguire et al 2009, Simonelli et al 2010; Ashtari et al., 2011; Russell et al. 2017; Bennet et al., 2018) erhalten Forschungen an Retinopathien aktuell viel Beachtung. Das Auge ist dabei als Forschungsobjekt oder Zielorgan für Behandlungen aufgrund mehrerer Aspekte besonders gut zugänglich.

Beispielsweise ist die okulare Mikroumgebung immunsuppressiv. Das Infiltrieren von Immunzellen in das Augengewebe unterliegt besonderer Regulation. Einer der immunsuppressiven Mechanismen wird durch spezifische lösliche Neuropeptide

und Wachstumsfaktoren über das Kammerwasser vermittelt und von retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) produziert (Zamiri et al., 2005 und 2006; Lau et al., 2009; Kawanaka et al., 2011; Tu et al., 2012). Als Folge der Hemmung der Entzündungsaktivität im Auge fallen immunologische Reaktionen beispielsweise auf Fremdantigene oder Transplantate im Auge deutlich geringer aus als in anderen Organen (Medawar, 1948; Grisanti et al., 1998; Streilein, 1999; Li et al., 2004; rezensiert von Caspi, 2006). Dies kam der Entwicklung richtungsweisender Therapien an der Retina zugute. Dazu gehört die erste erfolgreiche Behandlung der feuchten altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) und der diabetischen Retinopathie mit Antikörperfragmenten, die den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) binden. Der Wirkstoff wird intavitreal injiziert und hemmt die Blutgefäßausbildung (Elman et al., 2010; Rajendram et al., 2012; Arevalo et al., 2013; Brown et al., 2013; Korobenik et al., 2014). Auch die Anwendung von Retina-Implantaten profitiert von der immunsuppressiven Umgebung, weil dadurch geringe Abstoßreaktionen zu erwarten sind. Nachdem 2009 erste klinische Studien angelaufen waren, wurden 2011 bzw. 2013 zwei Retina-Implantate in Europa zur Behandlung einer Form von Retinitis Pigmentosa zugelassen (Humayun et al., 2012; Stingl et al., 2013).

Bei der Erforschung des Auges lässt sich außerdem auf mehrere spezifische bildgebende Verfahren zurückgreifen. Bedeutende Fortschritte in der Forschung gehen oft auf die Entwicklung bildgebender Verfahren zurück, die nichtinvasive Untersuchungen ermöglichen. Die Entwicklung der Magnetresonanztomographie (MRT) beispielsweise ließ eine detaillierte Darstellung der Gehirnstruktur zu und die funktionelle MRT (fMRT) und Positronen-Emissions-Tomografie (PET) zeichnen die Gehirnaktivität auf. MRT wird neben der Sonographie auch für die Forschung und diagnostischen Untersuchung auf dem Gebiet der Nephrologie eingesetzt. Meilensteine der Ophthalmologie machten die Entwicklung wertvoller bildgebender Verfahren möglich. Dazu gehören die Fundus-Kamera (Gullstrand et al., 1910) und die optische Kohärenztomographie (OCT) (Huang et al., 1991). Eine neue Dimension erreichte die Bildgebung der Retina durch die Weiterentwicklung des OCTs (rezensiert von van Velthoven et al., 2007) und die Implementierung der adaptiven Optik (Mujat et al., 2009). So wurden Untersuchung der Retina bei

lebenden Tieren und Patienten auf Mikrometer-Ebene möglich und sogar einzelne Photorezeptoren und Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) werden sichtbar. Des Weiteren sind die Entwicklung und der Aufbau des Vertebraten-Auges evolutionär hoch konserviert (rezensiert von Lamb et al., 2007). Dadurch sind Tiermodelle für viele Retinopathien gut geeignet zur Erforschung humarer Pathologien (rezensiert von Fletcher et al., 2011).

1.4 Morbus Best (M. Best) – Eine noch nicht therapierbare, seltene Retinopathie

Morbus Best (M. Best) (MIM 153700), auch bekannt als Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD), ist eine seltene, erblich bedingte Retinopathie mit einer Prävalenz zwischen 1:5.000 (Bitner et al., 2012) und etwa 1:50.000 (Nordstrom, 1974). Die Etymologie der Erkrankung geht auf den Arzt Friedrich Best zurück, der die Erkrankung erstmals 1905 beschrieb (Best, 1905). Erst im Jahr 1998 konnte gezeigt werden, dass die primäre Ursache für M. Best in genetischen Veränderungen des *Bestrophin-1* (*BEST1*) Gen liegt (Marquardt et al. 1998, Petrukhin et al., 1998).

1.4.1 Phänotyp und Diagnostik

M. Best ist eine früh symptomatische autosomal-dominante Makuladegeneration, die einen progressiven Sehverlust verursacht, wobei Penetranz und Expressivität innerhalb von Familien als auch zwischen Familien stark variieren können (Walter et al., 1994; Lacassagne et al., 2011). In ihren frühen Stadien ist die Krankheit durch eine Ansammlung von Lipofuszin-ähnlichem Material und subretinaler Flüssigkeit gekennzeichnet, die zu Retinaablösungen und definierten Läsionen führt (Abbildung 1). Diese ähneln klassischerweise in Fundusaufnahmen einem Eigelb (Weingeist et al., 1982). Obwohl die Krankheit mit zunehmendem Alter progradient ist, behalten viele Patienten bis weit in das vierte oder fünfte Lebensjahrzehnt hinein ein gutes zentrales Sehvermögen. Ein häufiger Endpunkt der Krankheit ist ein erheblicher Verlust an Photorezeptorzellen, der schließlich zu einer ernsthaften Sehbehinderung führt (Mohler und Fine, 1981).

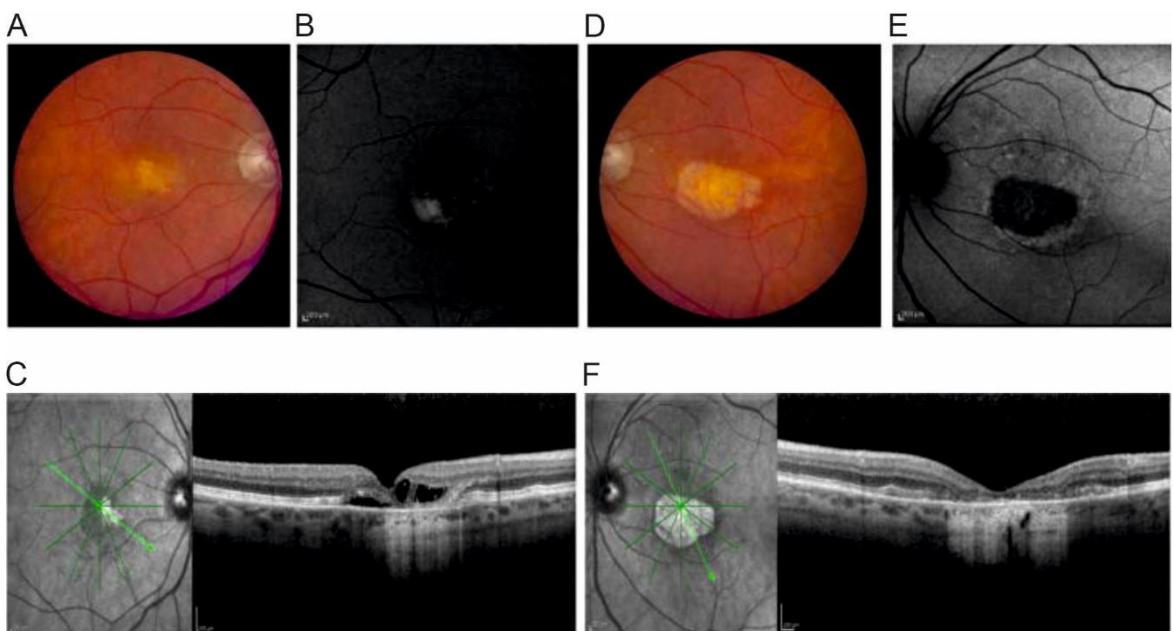


Abbildung 1: Klinische Darstellung des M. Best.

Eine klassische vitelliiforme Läsion findet sich sowohl im rechten (A) als auch im linken (D) Auge einer 80-jährigen Patientin mit M. Best. Beide Läsionen waren autofluoreszierend (B, E). Die OCT-Aufnahme eines horizontalen Schnitts der linken (C) und rechten (F) Makula ergab Retinaanomalien. Insbesondere das linke Auge zeigte eine angehobene Retina und mehrere mit Flüssigkeit gefüllte, ernsthafte Retinaablösungen (modifiziert nach Johnson et al., 2017).

Neben der klassischen singulären, zentralen vitelliiformen Läsion kann sich die Erkrankung seltener auch als „multifokaler M. Best“ mit multiplen, meist kleineren vitelliiformen Läsionen am posterioren Augenpol manifestieren. Die Symptome sind aber ansonsten dem des klassischen M. Best sehr ähnlich (Ciulla und Frederick, 1997; Lacassagne et al., 2011).

M. Best wird in der Regel durch Fundus-Untersuchungen, Elektro-Okulogramm-Messungen (EOG) und unter Zuhilfenahme der Familienanamnese diagnostiziert. Ein Kennzeichen ist das abnormale Arden-Verhältnis in den EOG-Antworten (Abbildung 2). Das EOG zeigt regulär nach einer Dunkel-Phase einen starken Anstieg des Ruhepotentials durch Licht-Stimulation. Dieser gemessene Anstieg wird durch Chlorid-vermittelte Depolarisation der Basalmembran des RPE erzeugt. Die Veränderung in M. Best gegenüber dem typischen normalen EOG-Verlauf ist ein Indiz für eine spezifische Beeinträchtigung des RPEs (Bard und Cross, 1974).

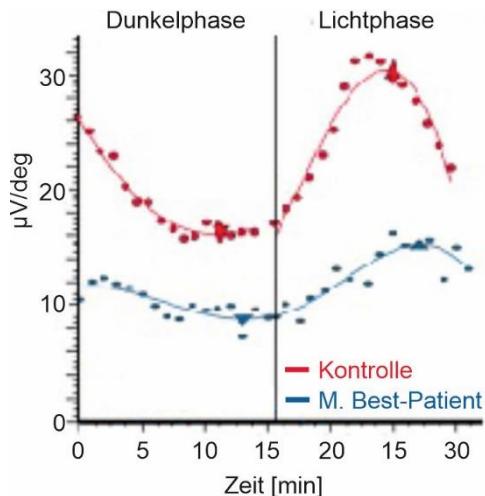


Abbildung 2: Anomales Arden-Verhältnis im EOG eines M. Best-Patienten.

Die Grafiken zeigen mittlere EOG-Reaktionen auf Licht eines normalen (rot) und eines M. Best-Patienten mit R218H-Mutation (blau). Die normale Zunahme der elektrischen Reaktion auf Licht setzte bei 15 min ein und erreichte bei 25 min den Höhepunkt. Im Patienten ist diese Lichtanstiegsreaktion sowohl gedämpft als auch langsamer (Abbildung modifiziert aus Moshfeg et al., 2016).

1.4.2 Klinisches Spektrum der Bestrophinopathien

Neben M. Best (MIM 153700) gibt es noch weitere, durch Mutationen im *BEST1*-Gen verursachte, seltener vorkommende Retinopathien, die gemeinsam als Bestrophinopathien zusammengefasst werden. Dazu gehören die autosomal-dominante-vitelliforme Makuladystrophie (AVMD) (MIM 608161) (Allikmets et al., 1999; Krämer et al., 2000), die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) (MIM 193220) (Yardley et al., 2004) und die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (ARB) (MIM 611809) (Burgess et al., 2008).

Die verschiedenen Formen der Bestrophinopathien unterscheiden sich wie nachfolgend beschrieben durch die Art der Vererbung, das Alter beim Krankheitsausbruch sowie durch die Position und das Ausmaß der Retinaläsionen. Tritt M. Best erst in späteren Lebensdekaden auf, ist die Ausprägung oft milder, wobei der Visus besser erhalten bleibt und die Fundusläsionen kleiner und bräunlicher erscheinen. In diesen Fällen wird die Erkrankung der AVMD zugeordnet, wobei diskutiert wird, ob es sich aufgrund ihrer phänotypischen Übereinstimmungen (Hayami et al., 2003) bei AVMD und M. Best tatsächlich um zwei zu unterscheidende Erkrankungen handelt. ADVIRC-Patienten zeigen charakteristisch eine Anomalie der Augenentwicklung und anormale chorioretinale Pigmentierung in der Peripherie des hinteren Pols des Auges (Kaufman et al., 1982). Seit dem Jahr 2008 wurden vermehrt Familien mit einer rezessiven Vererbung von *BEST1*-Mutationen beschrieben. Betroffene sind in der Regel zusammengesetzt-heterozygote (Burgess et al., 2008) oder selten homozygote

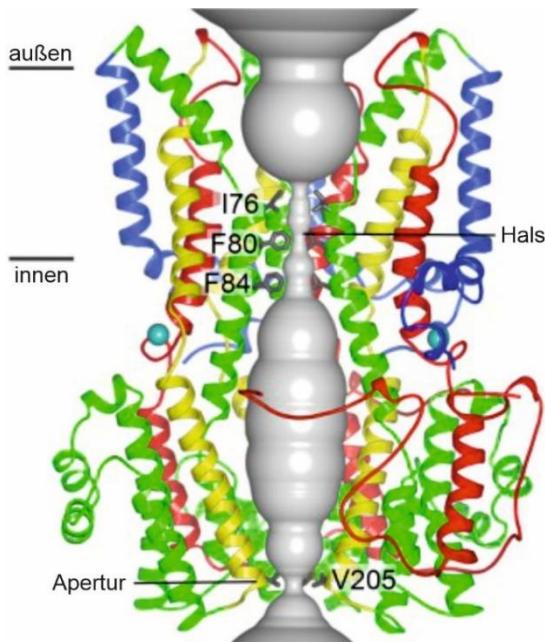
Träger von *BEST1*-Mutationen (Wong et al., 2010; Bitner et al., 2011). Im Gegensatz zum M. Best zeigen ARB-Patienten keine typischen vitelliformen Läsionen, sondern klassischerweise multifokale paramakuläre gelbliche Ablagerungen, die sich über die gesamte periphere Retina verteilen.

1.4.3 Expression, Funktion und Struktur von Bestrophin-1 (BEST1)

BEST1 wird im menschlichen Auge im RPE exprimiert (Marquart et al., 1998) und ist dort basolateral in der Plasmamembran lokalisiert (Marmorstein et al., 2000).

Die Funktion von *BEST1* ist zwar noch nicht vollständig geklärt, doch wurde seine Aktivität als Anionenkanal bereits ausführlich in einem transgenen Zellmodell von embryonalen humanen Nieren (human embryonic kidney, HEK) (rezensiert von Hartzell et al., 2008) und auch in einzelnen Studien mit endogenem *BEST1* in nativen Zellsystemen beschrieben (Li et al., 2017; Moshfegh et al., 2016). Außerdem wird *BEST1* eine Rolle in der Regulation des Zellvolumens (Milenkovic et al., 2015), der Kalziumhomöostase (Singh et al., 2013; Marmorstein et al., 2015) und des transepithelialen Potenzial des RPE zugeschrieben (Marmorstein et al., 2015).

2014 wurde die Kristallstruktur des Hühnchen-*BEST1* aufgedeckt (Kane Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014). Diese zeigt, dass der Kanal aus einem Homopentamer von identischen *BEST1*-Einheiten gebildet wird und eine 95 Å breite Pore bildet (Abbildung 3). Diese Pore ist gerade groß genug ist, um ein dehydriertes Chloridion passieren zu lassen. Zwei Verengungen in der Pore formen einen „Hals“ (Aminosäuren I76; F60 und F84) und eine „Apertur“ (Aminosäure V205), welche als Ionenschleuse bzw. Ionenselektivitätskontrolle agieren (Vaisey et al., 2016). Strukturanalysen und elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass eine Anlagerung von Kalzium als auch eine Bindung von ATP zum Öffnen des „Halses“ führt, und ein Peptid am C-terminalen Ende des *BEST1* eine Rolle bei dessen Inaktivierung spielt (Zhang et al., 2018a und b).

**Abbildung 3: BEST1-Proteinstruktur.**

Bändermodell des BEST1-Pentamers. Die Ionenpore (grau) wird als Darstellung des minimalen radialen Abstands von der Mittelachse zum nächsten Van-der-Waals-Proteinkontakt dargestellt. Sekundäre Strukturelemente sind gemäß den 4 Segmenten des Kanals (S1, blau; S2, grün; S3, gelb; und S4 und C-terminaler Schwanz, rot) gefärbt. Kalziumionen sind als petrofarbene Kugeln dargestellt und zusätzlich sind die ungefähren Grenzen der Lipidmembran angegeben. (Abbildung modifiziert nach Vaisey und Long, 2018).

1.4.4 Molekulare Pathomechanismen

Bis heute wurden mehr als 300 unabhängige krankheitsverursachende Mutationen im *BEST1*-Gen dokumentiert (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>). Diese Mutationen beeinflussen die *BEST1*-Lokalisation (Mullins et al., 2005; Davidson et al., 2009; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2013; Johnson et al. 2014), die Proteinstabilität (Uggenti et al., 2016; Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020) und die Ionenpermeabilität (Lee et al., 2010; Johnson et al., 2013; Moshfegh et al., 2016; Ji et al., 2019). In der Folge führen diese strukturellen Veränderungen zu Beeinträchtigungen der Funktion des *BEST1*-Chloridkanals (rezensiert von Hartzell et al., 2008; Xiao et al., 2010; Lee et al., 2010; Johnson et al., 2013; Milenkovic et al., 2015; Moshfegh et al., 2016; Li et al., 2017; Ji et al., 2019). Außerdem beeinflussen *BEST1*-Mutationen auch die Kalziumhomöostase (Singh et al., 2013; Marmorstein et al., 2015), den Abbau von Außensegmenten der Photorezeptoren (engl. *photoreceptor outer segments*, POS) (Singh et al., 2013) und die Zell-Volumenregulation (Milenkovic et al., 2015).

Kryoelektronenmikroskopie und elektrophysiologische Aufzeichnungen bestätigten, dass die Einführung verschiedener Mutationen in die *BEST1*-Kanalstruktur Veränderungen der relativen Permeabilität zwischen Anionen

verursacht, Kanäle mit dramatisch veränderten Gate-Eigenschaften erzeugt und die Kanalinaktivierung verringert (Miller et al., 2019).

Interessanterweise liefert die Aufklärung der BEST1-Kanalstruktur (Kane Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014) eine Erklärung für den in funktionellen Studien beobachteten dominant-negativen Effekt von mutiertem BEST1 (Mullins et al., 2005; Johnson et al., 2014; Milenkovic et al., 2015). Unter der Annahme einer vergleichbaren Expression von nicht-mutiertem und mutiertem BEST1 führt der Einbau einer einzelnen mutierten Untereinheit in den fünfteiligen Kanalkomplex zu einem nicht-funktionstüchtigen Kanal. Theoretisch setzt sich bei einem autosomal dominanten Erbgang nur 3 % aller gebildeten Kanalkomplexe aus fünf regulären BEST1-Untereinheiten zusammen (rezensiert von Milenkovic et al., 2020).

Eine Besonderheit der Bestrophinopathien ist die Tatsache, dass verschiedene Mutationen desselben Gens zu individuellen Erkrankungsbildern mit unterschiedlichen Vererbungsmustern und verschiedenen klinischen Manifestation führen. An unserem Institut konnten dazu kürzlich klare Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen M. Best, BRD und ADVIRC in BEST1-Lokalisation, -Stabilität, -Degradationsweg und -Ionentransport aufgedeckt werden (Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020). Während BEST1 mit einer ARB-assoziierten Mutation nach der Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum erkannt und dem 26s-Proteasom zum Abbau zugeführt wird, entgeht BEST1 mit einer autosomal dominanten Mutation die proteasomale Degradation und wird erst über den lysosomalen Degradationsweg abgebaut. Bei M. Best als auch ARB liegt eine starke Verringerung der BEST1-vermittelten Anionentransportfunktion vor. ADVIRC-Mutationen hingegen lösen eine erhöhte Anionenpermeabilität aus, was auf eine Beeinträchtigung des Schließmechanismus des Kanals schließen lässt.

1.5 Konzepte zur Therapie der Bestrophinopathien

Bis heute steht keine Therapie zur Behandlung des M. Best oder verwandten BEST1-assoziierten Retinopathie zur Verfügung. Mehr als 20 Jahre nach der Entdeckung des *BEST1*-Gens (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998) gibt es jedoch erste vielversprechende Behandlungsansätze.

1.5.1 Gentherapie

Aufgrund der rezessiven Vererbung des ARB ist eine Genadditionstherapie denkbar. Erste vielsprechende Ergebnisse einer Genadditionstherapie bei ARB wurden bei einem Hundemodell mit einer autosomal-rezessiven Bestrophinopathie berichtet (Guziewicz et al., 2018). Wegen des dominant-negativen Effekts beim autosomal-dominanten M. Best scheint hier intuitiv eine Genadditionstherapie nicht erfolgsversprechend. Dennoch zeigten jüngst Versuche zu Genadditionstherapien im Zellmodell sowohl Verbesserungen der BEST1-Kanalfunktion bei ARB-Mutationen, als auch ähnlich starke Effekte für M. Best-assoziierte Mutationen (Ji et al., 2019).

Ebenfalls ein aussichtsreicher Therapieansatz für M. Best könnte die CRISPR/Cas-basierte Genomeditierung sein, um so gezielt pathogene BEST1-Varianten mit dominant-negativem Effekt auszuschalten. Voraussetzung dafür ist eine gezielte Genomeditierung für die mutierte DNA-Sequenz, bei vollständiger Intaktheit der normalen DNA-Sequenz. Die Wirksamkeit des „Allel-spezifischen“ CRISPR/Cas wurde im Mausmodell der autosomal dominanten Retinitis pigmentosa bereits bestätigt (Gianelli et al., 2018). Vor der Zulassung von CRISPR/Cas in der Klinik sind jedoch noch hohe Hürden zu überwinden. Herausforderungen dabei sind unter anderem unspezifische Effekte von CRISPR/Cas auf Sequenzen außerhalb des Zielgens (Off-Target), die Wahl einer effizienten Applikationsmethode und die Immunantwort auf Verabreichungsvehikel und auf das Cas9-Peptid. Derzeit ist noch keine CRISPR/Cas-basierte Therapie auf dem Markt zugelassen (Stand März 2020).

1.5.2 Arzneimittel-Screening im Hochdurchsatz

Der BEST1-Chorlidkanal erscheint als Angriffspunkt zur Wirkstoffbehandlung geeignet, blickt man auf die Therapieerfolge bei der Behandlung von Mukoviszidose. Wenngleich es sich bei der Mukoviszidose im Gegensatz zum M. Best um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung handelt, weisen die zugrundeliegenden Pathomechanismen bei beiden Erkrankungen auffällige Gemeinsamkeiten auf. Auch bei der Mukoviszidose liegt ursächlich eine Mutation in einem Chlorid-Kanal vor, dem *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance*

Regulator (*CFTR*). Wie einige der pathogenen *BEST1*-Varianten, sind auch pathogene *CFTR*-Varianten zellulär fehllokaliert und zeigen eine beeinträchtigte Kanalfunktion (Dalemans et al., 1991). Da die Mukoviszidose eine Prävalenz von 1:3.000 (Walters und Mehta, 2007) in Europa und Nordamerika zeigt und die Lebenszeit von Betroffenen stark verkürzt ist (rezensiert von Moran et al., 2009), wurde bereits weitreichende Forschung zur Identifizierung möglicher Therapeutika unternommen. Durch HTS wurden *Korrektoren* identifiziert, die den Transport von pathogenen Varianten des *CFTR* an die Plasmamembran wiederherstellen (van Goor et al., 2011, Clancy et al., 2012). Des Weiteren wurden *Potentiatoren* aufgedeckt, die den Anionentransport des mutierten *CFTR* erhöhen (Accurso et al., 2010). Eine Kombinationstherapie, bestehend aus dem *Korrektor* Tezacaftor und dem *Potentiator* Ivacaftor, wurde 2018 unter dem Markennamen Symkevi® zugelassen und eine Triple-Behandlung zweier *Korrektoren* und eines *Potentiators* (Tezacaftor, Ivacaftor und Elexacaftor) haben in klinischen Tests der Phasen II und III bei Patienten einen deutlichen Nutzen gezeigt (Davies et al., 2018). Die Entdeckung dieser *CFTR*-Modulatoren hat die Prognose für Patienten mit Mukoviszidose wesentlich verbessert.

Trotz der immensen Fortschritte in der Erforschung der Pathomechanismen der Bestrophinopathien wurden noch keine HTS zur Wirkstoffsuche entwickelt. Für die Entwicklung eines HTS bedarf es adäquater Zellsysteme. Mit der Generierung von humanen RPE (hiRPE)-Zellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) (Takahashi und Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007) steht uns heute ein hervorragendes Zellmodell zur Untersuchung von Pathomechanismen zur Verfügung. HiPSCs können individuell aus Patientenbiopsien oder Blutzellen gewonnen werden und dienen aufgrund ihrer Pluripotenz als Quelle für uneingeschränkt vermehrbare Mutations-spezifische humane induzierte RPE-Zellen (hiRPE), die in vielen charakteristischen Schlüsseleigenschaften nativen Zellen gleichen (Krohne et al., 2012; Buchholz et al., 2013; Maruotti et al., 2013; Singh et al., 2013, Brandl et al., 2014). Darüber hinaus werden *Madin Darby Canine Kidney II* (MDCKII) -Zellen, bei dem normale *BEST1*-Konstrukte oder Konstrukte mit pathogenen *BEST1*-Varianten stabil in die Zelle eingebracht wurden vielfach als Modellsystem verwendet (Davidson et al., 2011; Davidson et al., 2009; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2014; Johnson

et al., 2013; Milenkovic et al., 2018). In ihren Eigenschaften als Epithelzellen, können sie polarisiert werden und zeigen dadurch die authentische membranständige Lokalisation des wildtypischen BEST1 (Davidson et al., 2009; Davidson et al., 2011; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2014; Johnson et al., 2013).

Es an der Zeit, diese Modellsysteme und nun aufgedeckte BEST1-Pathomechanismen zu nutzen, um nach Wirkstoffen zu suchen.

1.6 Ziel der Arbeit – Entwicklung einer Hochdurchsatz-Screening (HTS)-Plattform zur Wirkstoffentdeckung

Trotz substantieller Forschungserfolge in den letzten 20 Jahren existiert bis heute noch keine konkrete Therapie oder Behandlung von Patienten, die an M. Best oder an einer der anderen Bestrophinopathien leiden. Ziel dieser Arbeit war es, einen Phänotyp-basierten Assay zu entwickeln, der zum Screening von Wirkstoffen im Hochdurchsatz geeignet sein sollte, um eine effektive Substanz zur Therapie von M. Best zu identifizieren.

Dazu wurden zunächst *BEST1*-exprimierende Zellmodelle generiert und charakterisiert. Es sollten Assays etabliert werden, mit deren Hilfe zuverlässig Unterschiede in der Funktion vom wildtypischen und mutantem BEST1 detektiert werden. Diese Assays wurden dann auf HTS-geeignete Formate angepasst. Damit sollten Wirkstoffkollektionen nach potentiellen BEST1-Modulatoren durchsucht werden, die das Potential haben, in der M. Best-Therapie eingesetzt zu werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Chemikalien

In Tabelle 1 sind die verwendeten Reagenzien und Chemikalien dieser Arbeit aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.

Reagenz / Chemikalie	Quelle
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	#H7637, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Adenosintriphosphat(ATP)-Dinatriumsalz	#A26209, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	#M133-100G, VWR, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	#M5655, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cäsiumchlorid	#289329, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cäsium-Methansulfonat	#C1426, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	#D8537, Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	#03777, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glukose	#1083370250, Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	#444485B, VWR, Darmstadt, Deutschland
Glycin	#3790, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	#1049361000, VWR, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid	#C1016, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	#T145.3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	#44916, Merck, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	#M4125-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
β-Mercaptoethanol	# A1108.0100, VWR, Darmstadt, Deutschland
Methanol	#1060091011, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	#9265, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumiodid	#S5102.500 Biomol, Hamburg, Deutschland
Nikotinamid	#N0636, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Odyssey® Blocking Puffer	# 927-50000, LI-COR Bioscience, Lincoln, USA
Polyacrylamid	#T802.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	#S7903, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	#A7249.1000, VWR, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	#0761, VWR, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	#T1503, Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	#A4975, VWR, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	#0777, VWR, Darmstadt, Deutschland

2.2 Wirkstoffkollektionen

Tabelle 2 zeigt 2 kommerzielle Wirkstoffkollektionen, die in HTS-Screenings eingesetzt wurden. Im Screening mittels Lokalisations-Assay wurde die Bioactive Compound Library verwendet. Die Spektrum-Kollektion wurde im Halogenidtransport-Assay verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Wirkstoffkollektionen.

Material	Umfang	Quelle
Bioactive Compound Library	2.654 Wirkstoffe	Selleckchem, Houston, USA
Spektrum-Kollektion	2.560 Wirkstoffe	MicroSource Discovery Systems, Gaylordsville, USA

2.3 Generierung und Kultivierung von *BEST1*-exprimierenden Zellsystemen

2.3.1 Generierung von stabil *BEST1*-exprimierenden *Madin Darby Canine Kidney (MDCKII)*-Zelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit standen dem Institut für Humangenetik bereits die hier verwendeten MDCKII-Zelllinien (Tabelle 3) zur Verfügung.

Tabelle 3: Generierte, stabil *BEST1* exprimierende MDCKII-Zelllinien.

Bezeichnung	Klinischer Befund	Exon	Nukleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch
MDCKII-BEST1-WT #17	gesund		Referenz	
MDCKII-BEST1-WT #21	gesund		Referenz	
MDCKII-BEST1-WT #66	gesund		Referenz	
MDCKII-BEST1-T6P	M. Best	2	c.16A>C	p.Thr6Pro
MDCKII-BEST1-L21V	M. Best	2	c.61C>G	p.Leu21Val
MDCKII-BEST1-W93C	M. Best	4	c.279G>C	p.Trp93Cys
MDCKII-BEST1-R218C	M. Best	6	c.652C>T	p.Arg218Cys
MDCKII-BEST1-L224M	M. Best	6	c.670C>A	p.Leu224Met
MDCKII-BEST1-Y227N	M. Best	6	c.679T>A	p.Tyr227Asn
MDCKII-BEST1-F305S	M. Best	8	c.914T>C	p.Phe305Ser

Zur Generierung von MDCKII-Zelllinien, die stabil normales und mutiertes *BEST1* exprimieren, wurden normale *BEST1*-Sequenzen in pcDNA3 kloniert und Mutationen wurden durch ortsgerechtete Mutagenese erzeugt (Milenkovic et al., 2011). *BEST1* voller Länge wurde durch Reverse Transkriptase-Polymerase-

Kettenreaktion (RT-PCR) aus mRNA von menschlichem RPE amplifiziert und direktional in den pCDNA3-Vektor kloniert. Missense-Mutationen wurden auf einem *BEST1*-cDNA-Template voller Länge (GenBank-Nummer NM_004183) unter Verwendung des QuickChange-Mutagenese-Kits (#200515, Stratagene, San Diego, USA) erzeugt. Die Konstrukte wurden mit den in der Tabelle 4 angegebenen Primerpaar-Kombinationen hergestellt. Die fertigen *BEST1*-Konstrukte wurden vollständig sequenziert, um sicherzustellen, dass die gezielte Mutagenese korrekt stattgefunden hatte und, um das Vorhandensein unerwünschter Sequenzänderungen auszuschließen. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem BigDye® Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit (#4336791, Applied Biosystems, Foster City, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und in einem Abi3130x1 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) sequenziert. Erhaltene Sequenzen wurden mittels SnapGene 2.8.2 (GSL Biotech LLC, Chicago, USA) analysiert.

Tabelle 4: Oligonukleotidpaare zur gezielten Mutagenese.

Nukleotidaustausch	Name	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')
c.16A>C	T6P-F	ATGACCACATCACTTACCCAAGCCAAGTGGCT
	T6P-R	AGCCACTTGGCTTGGTAAGTGATGGTCAT
c.61C>G	L21V-F	CCTTCTCCCGCCTGGTGTGCTGGCGGG
	L21V-R	CCCGGCCAGCACAGCACCCAGGCGGGAGAAGG
c.279G>C	W93C-F	CGTGACCCGCTGGTGCAACCAGTACGAGAAC
	W93C-R	GTTCTCGTACTGGTTGCACCAGCAGGGTCACG
c.652C>T	R218C-F	AGATGAACACCTTGTACTCAGTGTGGAC
	R218C-R	GTCCACACTGAGTACACAAGGTGTTCATCT
c.670C>A	L224M-F	CTCAGTGTGGACACATGTATGCCTACGACT
	L224M-R	AGTCGTAGGCATACATGTGTCCACACTGAG
c.679T>A	Y227N-F	GGACACCTGTATGCCAACGACTGGATTAGT
	Y227N-R	ACTAATCCAGTCGTTGGCATACAGGTGTCC
c.914T>C	F305S-F	AGGATGATGATGATTCTGAGACCAACTGGA
	F305S-R	TCCAGTTGGTCTCAGAATCATCATCATCCT

Die Transfektion von MDCKII-Zellen mit den pcDNA3-Konstrukten wurde mit Lipofectamine® 3000 Transfektionsreagenz (#L3000015, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. MDCKII-Zellen, die normales oder mutiertes *BEST1* exprimierten,

wurden 2 Wochen lang mit 500 mg/ml Geneticindisulfat(G418) -Lösung (#CP11, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) selektioniert, bevor sie in 96-Well-Platten als Einzelzellen ausgesät wurden, damit Reinkulturen generiert werden konnten.

2.3.2 Kultivierung von stabil *BEST1* exprimierenden MDCKII-Zelllinien

MDCKII wurden standardmäßig in 10 % FCS-MDCKII-Medium (Tabelle 5) kultiviert und alle 2 bis 3 Tage passagiert. Dies erfolgte durch 10-minütige Inkubation mit 0,02 % EDTA (#15575020, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in DPBS (#14190-169, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA). Anschließend konnten die Zellen durch Inkubation für 8 min mit 1x Trypsin-EDTA (#15400054, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) von den Zellkulturplatten gelöst, für 5 min bei 1000 rpm pelletiert und wieder in Medium aufgenommen werden. Damit wildtypisches BEST1 authentisch an der Plasmamembran lokalisiert, wurden MDCKII polarisiert. Dazu wurden die Zellen 5 Tage lang in 1 %-FCS-MDCKII-Medium gehalten, um das Überwachsen des einschichtigen, dichten Zellrasens zu verhindern.

Tabelle 5: Medien für die MDCKII-Zellkultur.

Medium	Zusammensetzung	Quelle
10 % FCS-MDCKII-Medium	89 % DMEM high glucose	#41965-062, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	10 % FCS	#10270106, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	1 % Penicillin-Streptomycin	#P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	500 mg/ml G418	#CP11, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
1% FCS-MDCKII-Medium	98 % DMEM high glucose	#41965-039, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	1 % FCS	#10270, GIBCO
	1 % Penicillin-Streptomycin	#P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.3.3 Generierung von humanen induzierten retinalen Pigmentepithel (hiRPE)-Zelllinien

Es wurden 7 hiRPE-Zelllinien generiert. Zwei davon gehen auf Zellen gesunder Spender und 5 auf Zellen von M. Best-Patienten zurück. Grunddaten der Patienten sowie die Befunde von Sequenzierungen des BEST1 werden in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Generierte hiRPE-Zelllinien.

Bezeichnung	Geschlecht	Alter	Klinischer Befund	Exon	Nukleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch
hiRPE-BEST1+/+	M	29	gesund		Referenz	
hiRPE-BEST1+/+	W	45	gesund		Referenz	
hiRPE-BEST1-N11K/+	M	61	M. Best	2	c.33T>G	p.Asn11Lys
hiRPE-BEST1-R218C/+	M	36	M. Best	6	c.652C>T	p.Arg218Cys
hiRPE-BEST1-Q238R/+	M	70	M. Best	6	c.713A>G	p.Gln238Arg
hiRPE-BEST1-A243V/+	M	36	M. Best	7	c.728C>T	p.Ala243Val
hiRPE-BEST1-I295del/+	M	46	M. Best	8	c.884_886del TCA	p.Ile295del

Die Generierung von hiRPE erfolgte leicht abgewandelt nach dem Protokoll von Brandl et al. 2014. Um zunächst Zellkulturen von humanen Fibroblasten (hFib) zu generieren, wurden Hautbiopsien von gesunden Spendern und M. Best-Patienten entnommen. Von den Materialproben wurden Fettzellen entfernt, das restliche Gewebe mit einer Pinzette zerkleinert und auf einer Zellkulturplatte leicht angetrocknet, bevor hFib-Medium (Tabelle 7) dazugegeben wurde. So konnten in 2 bis 3 Wochen hFib auf der gesamten Fläche der 10 cm-Zellkulturplatten auswachsen.

Die episomale Rückprogrammierung erfolgte nach einem angepassten Protokoll nach Okita et al. 2012. Die folgenden, dazu benötigten Plasmide wurden über Addgene (Cambridge, USA) von Prof. Dr. Shinya Yamanaka (Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Japan) zur Verfügung gestellt: pCBX-EBNA1 (#41857), pCE-hSK (#41814), pCE-hUL (#41855), pCE-hOct3/4 (#41813) und pCE-mp53DD (#41856). HFib wurden aufgetaut, bis zu einer Konfluenz von 85 % kultiviert und mittels 0,05 % Trypsin-EDTA (#15300-54, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) von der Zellkulturplatte gelöst. Anschließend wurden 600.000 Zellen mit jeweils 600 ng der oben genannten Plasmide transfiziert. Dies erfolgte mittels Elektroporation im Programm U23 am Nucleofector™ 2b Device (#AAB-1001 Lonza, Basel, Schweiz) unter Verwendung des Human Dermal Fibroblast

NucleofectorTM Kits (#VPD-1001, Lonza, Basel, Schweiz). Anschließend wurden die Zellen für 24 h in hFib-Medium mit 100 µM Natriumbutyrat (#Cay11323-1, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) gehalten, bevor das hFib-Medium auf TeSRTM-E7TM umgestellt wurde. Etwa 14 Tage nach der Elektroporation wurden erste iPSC-Klone sichtbar und nach ca. 20 Tagen konnten entstandene iPSC-Klone aus dem Zellrasen isoliert und in mTeSRTM1 mit 50 mg/ml Gentamicin (#15750-060; Life Technologies, Carlsbad, USA) auf hiPSC-spezifisches Matrikel (#354277, Corning, New York, USA) -beschichtete Platten überführt werden.

Zur Differenzierung in hiRPE wurden iPSC zunächst 14 Tage lang im dichten Zellrasen gehalten. Ab dann wurden die Zellen in hiRPE-Medium kultiviert. In Woche 4 bis 5 nach dieser Umstellung wurde dem hiRPE-Medium 62 ng/ml Activin A (#120-14E, Peprotech, Rocky Hill, USA) zugesetzt. Ab der 6. Woche waren pigmentierte Zellcluster zu erkennen, die mit einem Skalpell ausgeschnitten und auf neue Zellkulturplatten überführt wurden, die mit hiRPE-spezifischem Matrikel® (#356253, Corning, New York, USA) beschichtet waren.

Tabelle 7: Medien für die Generierung und Kultivierung von hiRPE.

Medium	Zusammensetzung	Quelle
hFib-Medium	90 % DMEM, high glucose	#41965-039, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	10 % FBS	#10270, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	1 % Penicillin-Streptomycin	#15140-22, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TeSR TM -E7 TM		#50910, STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanada
mTeSR-Medium	mTeSR TM 1	#05850, STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanada
hiRPE-Medium	76,3 % KnockOut TM DMEM	#10829-018, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	10 mM Nikotinamid	#N0636, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	20 % KOSR	#10828-28, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	1 % MEM Non-Essential Amino Acids Solution	#11140-050, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	1 % Penicillin-Streptomycin	#15140-22, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	1 % 200mM L-Glutamin	#25030-024, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	0.7 % β-Mercaptoethanol	#A1108.0100, VWR, Darmstadt, Deutschland
	50 mg/ml Gentamicin	#15750-060; Life Technologies, Carlsbad, USA

Die generierten hiRPE wurden auf Patienten-spezifische *BEST1*-Mutationen hin analysiert. Dazu wurde DNA aus hiRPEs gemäß Laird et al. 1991 extrahiert. GoTaq[®] DNA Polymerase (# M317, Promega, Mannheim, Deutschland) wurde zur

PCR-Amplifikation eingesetzt. Für die Sanger-Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) verwendet und die Reaktionen auf einem ABI3130X1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Erhaltene Sequenzen wurden mittels SnapGene 2.8.2 (GSL Biotech LLC, Chicago, USA) analysiert.

2.3.4 Kultivierung von hiRPE-Zelllinien

Standardmäßig wurden hiRPE nach dem Auftauen 2-mal passagiert und zur Polarisierung mindestens 4 Wochen auf Transwell-Filtern (#657641, Greiner, Kremsmünster, Österreich) in hiRPE-Medium gehalten. Zum Passagieren wurden die Zellen mittels TrypLE-Behandlung (#12563029, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) von Platten oder Transwell-Filtern gelöst. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm pelletiert und in frischem hiRPE-Medium aufgenommen. Zellkulturplatten und Transwell-Filter wurden mit Matrigel® (#356230, Corning Inc., Corning, USA) beschichtet.

2.4 Generierung des BEST1-3D-Strukturmodells

Für die *in-silico*-Modellierung wurde die 3D-Struktur des Hünchen-BEST1 (cBest: PDB ID 4rdg) (Dickson et al., 2014) in die Software YASARA Structure (Version 18.2.7, YASARA Biosciences GmbH, Österreich) implementiert und Positionen der ausgewählten Mutationen wurden farbig markiert.

2.5 RNA-Isolierung, Reverse Transkription (RT) und Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Gesamt-RNA wurde aus hiRPE und MDCKII unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (#74204, Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die cDNA-Synthese aus 1 µg Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung der RevertAid™ Reverse Transkriptase und Random Hexamer Primer (#50142, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Für RT-PCR-Reaktionen wurden 50 ng cDNA als Matrizen für die PCR mit GoTaq Polymerase

(#M7848, Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die RT-PCR-Amplifikation von humanem BEST1 wurde unter Verwendung der Oligonukleotid-Paare TU15newF2 (5'-cag tac gag aac ctg ccg tg -3') / TU15newR1 (5'- ggt agg ctc agt ttc tcc aaa-3') durchgeführt.

2.6 Proteinprobenvorbereitung, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot-Analyse

MDCKII- und hiRPE-Zellen wurden von Zellkulturplatten oder Transwell-Filtern geerntet, 10 min bei 40 % am Vibra Cell VCX400 Ultrasound Gerät (Sonics & Materials, Newtown, USA) sonifiziert, mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden auf ein 3 % Polyacrylamid-Sammelgel bzw. ein 12,5 % Polyacrylamid-Trenngel aufgetragen (Tabelle 8) und eine Spannung von 150 V für 60 min angelegt. Als Größenstandart wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingesetzt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.

Gel	Zusammensetzung
12,5 % Polyacrylamid-Sammelgel	3,38 ml Tris-HCl pH 8,8 (1 M) 3,75 ml Polyacrylamid (40 %) 100 µl SDS (20 %)
3 % Polyacrylamid-Trenngel	2,76 ml Tris-HCl pH 6,8 (1 M) 0,55 ml Polyacrylamid (40 %) 50 µl SDS (20 %)

Nach der SDS-PAGE wurden Proteine durch einen Semi-Dry-Blot mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) auf PVDF Membranen (#926-31097, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) übertragen. Diese wurden für 30 sec in Methanol aktiviert, in Towbin-Puffer überführt und dort 5 min equilibriert. Whatman-Papiere (#A126.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) sowie die SDS-Gele wurden ebenfalls in Towbin-Puffer equilibriert. Der Proteintransfer von Gelen zu Membranen wurde für 40 min bei 24 V durchgeführt. Nach dem Blotten wurden die Membranen für 1 h bei

Raumtemperatur in Block-Lösung inkubiert und dann über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörpern (Tabelle 9) inkubiert. Vor der Inkubation mit sekundären Antikörpern (Tabelle 10) wurden die Membranen 3-mal in TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern wurde 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach erneutem Waschen der Membranen (3 x 10 min in TBS-T) wurden die Proteinbanden mit Clarity™ ECL-Western Blot-Substrat (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany) gemäß den Anweisungen des Herstellers im Odyssey FC-Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) sichtbar gemacht. Die Aufnahmen und die Auswertung der Daten wurde mit der Software Image Studio (LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, USA) vorgenommen.

Tabelle 9: Primäre Antikörper für Western Blot-Analysen.

Antikörper	Verdünnung	Quelle
α-RHO-1D	1:5.000	Prof. Dr. Robert S. Molday, Department of Ophthalmology and Visual Sciences, University of British Columbia, Kanada
α-ACTB	1:10.000	#A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α-CAT	1:5.000	#ab1877, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Western Blot-Analysen.

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Rdye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody	1:10.000	#P/N926-68070, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody	1:10.000	#P/N926-32213, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Die Zusammensetzungen aller Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE-Proteinanalyse sind in Tabelle 11 beschrieben.

Tabelle 11: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE-Protein-Analyse.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
5x Lämmli	0,01 % Bromphenolblau	2 % SDS
	60 mM Tris-HCl pH 6,8	10 % Glycerol
	5 % β-Mercaptoethanol	in destilliertem Wasser
Towbin-Puffer	190 mM Glycin	20 % Methanol
	0,25 mM Tris	in destilliertem Wasser
TBS-T	0,1 % Tween® 20	
	TBS	

Block-Lösung	5 % Magermilchpulver in TBS-T
Antikörperlösung	5 % Magermilchpulver in 1x TBS-T

2.7 Immunozytochemische Färbungen

Polare MDCKII oder hiRPE-Zellen wurden zunächst für 10 min bei 4 % Paraformaldehyd (#J61899.AK, VWR, Darmstadt, Deutschland) in DPBS (#14190-169, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) fixiert. Nach 1-maligem Waschschnitt mit DPBS wurden unspezifische Bindestellen durch 25 minütige Inkubation der Zellen mit Block-Lösung (Tabelle 12) abgesättigt. Die Antikörperlösung mit primären Antikörpern (Tabelle 13) wurde über Nacht inkubiert und 3-mal mit DPBS abgewaschen. Die Lösung mit den sekundären Antikörpern (Tabelle 14) wurde zusammen mit 0,4 mg/l DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 2 h inkubiert und ebenfalls 3-mal mit DPBS abgewaschen.

Tabelle 12: Lösungen für Immunozytochemische Färbungen.

Lösung	Zusammensetzung	Quelle
Block-Lösung	10 % Goat Serum 3 % Triton-X-100 in DPBS	#ab7481, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich #A4975, VWR, Darmstadt, Deutschland #14190-169, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Antikörperlösung	2,5 % Goat Serum 1 % Triton-X-100 in DPBS	#ab7481, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich #A4975, VWR, Darmstadt, Deutschland #14190-169, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 13: Primäre Antikörper für immunozytochemische Färbungen.

Antikörper	Typ	Spezies	Verdünnung	Quelle
α-BEST1 (C2/C3)	poly-klonal	Kaninchen	1:250	in unserem Auftrag produziert von Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland
α- CTNNB1	mono-klonal	Maus	1:1.000	#610153, BDBioscience, Franklin Lakes, USA

Tabelle 14: Sekundäre Antikörper für immunozytochemische Färbungen.

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Goat anti-mouse Alexa Fluor® 488	1:650	#A32723, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 549	1:650	#A32731, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA

Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488	1:650	#A32740, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Goat anti-mouse Alexa Fluor® 549	1:650	#A32742 Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA

Nach Färbungen von Zellen auf Deckgläschen oder Transwell-Filtern wurden diese mit DAKO Fluorescent Mounting Medium (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) auf Objektträger aufgebracht. Fotos der Färbungen auf Objektträgern wurden am konfokalen Mikroskop (VisiScope CSU-X1 Confocal System Microscope, Bositron Systems, Puchheim, Deutschland) angefertigt. Kapitel 2.13 beschreibt, wie die immunozytochemische Färbung sowie deren Datenauslese ans 384-Well-Format angepasst wurde.

2.8 Halogenidtransport-Assay

Es wurden zunächst Lentivirus-Partikel mit der Sequenz des gut etablierten Halogenid-Biosensors *YFP-H148Q/I152L* (Jayaraman et al., 1999) hergestellt, womit MDCKII transduziert werden konnten. Zur Partikel-Herstellung wurden HEK293T (ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Germany) mit dem gelben Fluoreszenzprotein *YFP-H148Q/I152L-pLJM1* und den Helperplasmiden *pMD2.G* und *psPAX2* unter Verwendung der Kalziumphosphat-Transfektionsmethode cotransfiziert. Diese Plasmide wurden über Addgene (Cambridge, USA) von Prof. Didier Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Für Messungen des Halogenidtransports wurden polarisierte MDCKII für 10 min in einer 100 mM Natriumchlorid-Lösung (Tabelle 15) equilibriert und der Basalwert gemessen. Anschließend wurde die Natriumchlorid-Lösung mit äquimolarer Natriumiodid-Lösung ersetzt. Fluoreszenzintensitäten wurden alle 60 sec am FLUOstar OPTIMA Microplate Reader (BMG Labtech, Allmendgrün, Deutschland) oder alle 8 sec bzw. 10 sec am Spark® Multimode Microplate Reader (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) gemessen. Das Wechseln der Lösungen auf der 96-Well-Platte wurde per Hand mit einer 8-Kanal-Pipette durchgeführt.

Tabelle 15: Lösungen für den Halogenidtransport-Assay.

Lösung	Zusammensetzung	
Natriumchlorid-Lösung	100 mM Natriumchlorid	1mM Kalziumchlorid
	1 mM Kaliumchlorid	1 mM HEPES
	1 mM Magnesiumchlorid	1 mM Glukose
Natriumiodid-Lösung	100 mM Natriumiodid	1mM Kalziumchlorid
	1 mM Kaliumchlorid	1 mM HEPES
	1 mM Magnesiumchlorid	1 mM Glukose

2.9 Patch-Clamp-Setup

Das Patch-Clamp-Setup (Abbildung 4

Abbildung 4) wurde im Rahmen dieser Arbeit am Institut für Humangenetik geordert, installiert und etabliert. Dessen Komponenten sind in Tabelle 16 aufgelistet.



Abbildung 4: Neu installiertes **Patch-Clamp-Setup** am Institut für Humangenetik.

(A-J) Markierte Komponenten des Setups werden nachfolgend in Tabelle 16 benannt.

Tabelle 16: Komponenten des Patch-Clamp-Setups.

Symbol	Komponente	Quelle
(A)	CleanBench Anti-Vibrations-Tisch mit Faraday'schem Käfig TypII	TMC, Peabody, USA
(B)	Perfusionssystem ALA VC3-8xP Series mit Pressure Regulator PR-10	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA
(C)	Kamera SciCam Pro	Scientifica, Uckfield, Vereinigtes Königreich
(D)	Mikroskop Olympus IX73	Olympus, Tokio, Japan
(E)	UMP Micromanipulation System	Sensapex, Oulu, Finland
(F)	Durchlicht-Lichtquelle Olympus TH4-200	Olympus, Tokio, Japan
(G)	Fluoreszenz-LED-Lichtquelle	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
(H)	Temperaturregler TC-20-WT	NPI Elektronic, Tamm, Deutschland
(I)	EPC10-Patch-Clamp-Verstärker	HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland
(J)	Vakuum Waste Kit	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA
(K)	Mikropipetten-Zuggerät DMZ-Zeitz-Puller	Zeiss-Instruments, Martinsried, Deutschland

HiRPE-Zellen wurden trypsinisiert und auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen (#F2006, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zur elektrophysiologischen Charakterisierung ausgesät. Zellen wurden während der Messungen in der externen Lösung (290 mosmol/kg; pH = 7,4, Tabelle 17) gehalten. Die *Patch-Clamp*-Aufzeichnung wurden in der *Whole-Cell*-Konfiguration durchgeführt und durch die Software PatchMaster v2x90.2 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) gesteuert. Die Kapazität und der Serienwiderstand wurden unter Verwendung des eingebauten Kompensationsalgorithmus eingestellt. Die Spitzen der Patch-Pipetten hatten einen Widerstand von 3 bis 5 MΩ und wurden mit einer Pipetten-Lösung (290 mosmol/kg; pH = 7,2) gefüllt, die 0,38 μM freies Kalzium enthielt (berechnet nach: <http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-TS.htm>). Spannungsgesteuerte Einwärts- und Auswärtsströme wurden durch Anlegen von Spannungsrampen (500 msec Dauer) von -60 bis +120 mV in Intervallen von 2 sec induziert.

Tabelle 17: Lösungen für Patch-Clamp-Messungen.

Lösung	Zusammensetzung	
Pipetten-Lösung; 290 mosmol/kg	40 mM Cäsiumchlorid 10 mM Cäsium-Methansulfonat 10 mM HEPES 5 mM EGTA	3 mM ATP-Dinatriumsalz 1,93 mM Kalziumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid
Externe Lösung; 290 mosmol/kg	150 mM Natriumchlorid 10 mM HEPES 10 mM Glukose	6 mM Cäsiumchlorid 1,5 mM Kalziumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid

Zur Etablierung der BEST1-Aktivierung wurden zusätzlich Lösungen aus Tabelle 18 getestet. Hypoosmotische Lösungen und deren Referenz-Isoosmotische Lösungen wurden durch Mannitol (#M4125-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) am Osmomat 030 (Gonotec, Berlin, Deutschland) auf die gewünschte Osmolarität eingestellt.

Tabelle 18: Getestete Lösungen zum Etablieren der Patch-Clamp-Messungen.

Lösung	Zusammensetzung	
Pipetten-Lösung mit 0,05 µM freiem Kalzium; 290 mosmol/kg	40 mM Cäsiumchlorid 10 mM Cäsium Methansulfonat 10 mM HEPES 5 mM EGTA	3 mM ATP-Dinatriumsalz 0,38 mM Kalziumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid
Hypoosmolare Lösung; 210 mosmol/kg	58 mM Natriumchlorid 10 mM HEPES 10 mM Glukose	6 mM Cäsiumchlorid 1,5 mM Kalziumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid

2.10 Photorezeptor-Außensegment (POS)-Degradations-Assay

Zur Untersuchung der POS-Degradation in hiRPE wurden eigens isolierte POS verwendet. Letztere wurden, wie von Brandl et al. 2014 beschrieben, aus porzinen Retinae gewonnen. Diese wurden mit 20 % Saccharose (#S7903, Merck, Darmstadt, Deutschland) homogenisiert und mit einem Proteaseinhibitor (#04693116001, Roche, Mannheim, Germany) versetzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 g und 4 °C wurde der Überstand erneut mit 20 % Saccharose und Proteaseinhibitor homogenisiert und anschließend durch Dichtegradienten-Zentrifugation (100.000 g, 120 min, 4 °C) aufgetrennt. Die Fraktion mit den POS konnte so isoliert, mit 0,02 M Tris-Puffer (#T1503, Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült und 10 min bei 10.000 g zentrifugiert werden.

Es wurden einmalig ca. 20 POS pro Zelle für 2 h in hiRPE-Medium auf polarisierte hiRPE gegeben. Die Zellen wurden anschließend 5-mal mit PBS gewaschen, um nicht phagozytierte POS zu entfernen. Danach wurden an mehreren Zeitpunkten von 1 bis 48 h die Zellen geerntet. Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse untersucht.

2.11 Biopartikel-Phagozytose-Assay

PHrodo™ Green *Escherichia coli* (*E. coli*) BioParticles™ Konjugate (#P35366, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers mit 100 µL pro Vertiefung auf der 96-Well-Platte in Live Cell Imaging Solution (#A14291DJ, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) einmalig auf polarisierte hiRPE gegeben. Mikroskopische Aufnahmen wurden dann stündlich in 40-facher Vergrößerung an je 3 Bereichen pro Vertiefung durch das IncuCyte® S3 Live-Cell Analyse System (Satorius, Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Die Steuerung und Auswertung der Aufnahmen erfolgte durch die Software IncuCyte® Zoom System (Satorius, Göttingen, Deutschland).

2.12 Zellvolumen-Messungen

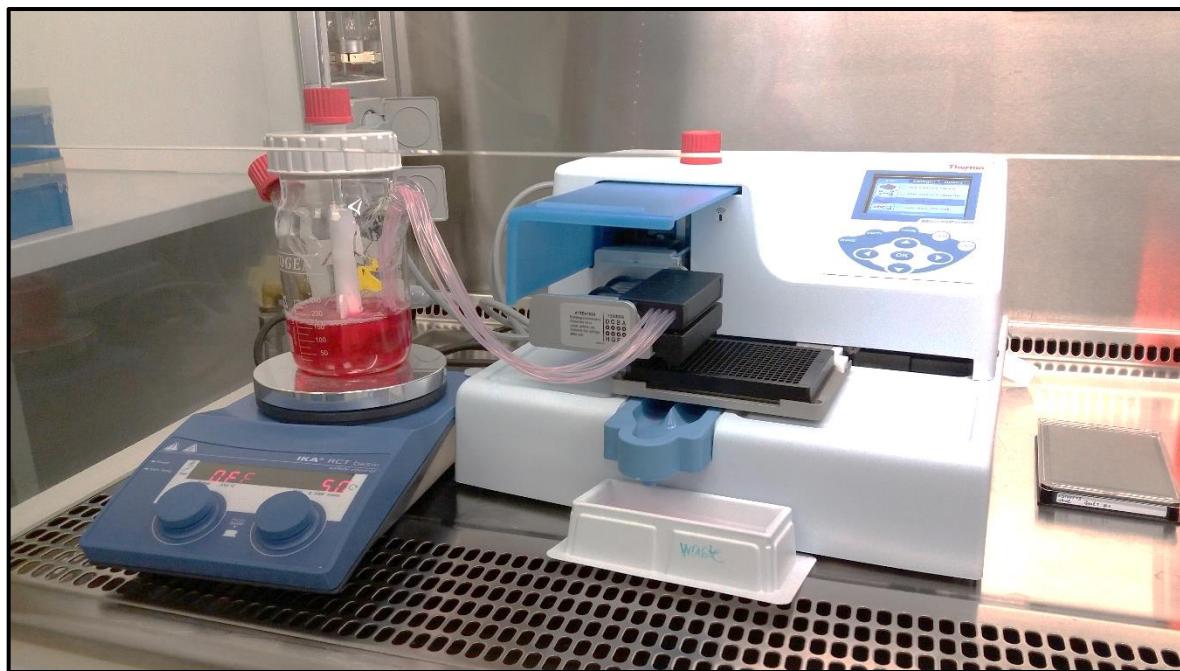
24 h vor der Volumenmessung wurden die polarisierten hiRPE von Transwell-Filtern auf Zellkulturplatten umgesetzt. Dann wurden sie von der Platte gelöst, bei 1000 rpm pelletiert, in isoosmotische Lösung (Tabelle 19) aufgenommen und 1 h im VWR Rotator (VWR, Darmstadt, Deutschland) bei 37 °C equilibriert. Es folgte die Zellvolumen-Messung am CASY® TT Zell-Zähler (Innovatis Roche AG, Bielefeld, Deutschland). Für Messungen der Volumenregulationsabnahme wurden die Zellen nachfolgend bei 0,3 rpm pelletiert und in hypoosmotische Lösung aufgenommen. Hypoosmotische Lösung und deren Referenz-Isoosmotische Lösung wurden durch Mannitol (#M4125-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) am Osmomat 030 (Gonotec, Berlin, Deutschland) auf die gewünschte Osmolarität eingestellt.

Tabelle 19: Lösungen für Zellvolumen-Messungen.

Lösung	Zusammensetzung		
Isoosmotische Lösung; 290 mosmol / kg	72,5 mM Natriumchlorid 1 mM Kaliumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid 1mM Kalziumchlorid	1 mM HEPES 1 mM Glukose 145 mM Mannitol	
Hypoosmotische Lösung; 210 mosmol / kg	72,5 mM Natriumchlorid 1 mM Kaliumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid	1mM Kalziumchlorid 1 mM HEPES 1 mM Glukose	

2.13 Roboterautomatisierung des Lokalisations-Assays

Mit dem Thermo Scientific Multidrop Kombi Reagenzien-Dispenser (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) unter Einsatz der Multidrop Combi Dispenserkassette (#735-0452, VWR, Darmstadt, Deutschland) wurden 15.000 MDCKII-Zellen pro Vertiefung auf die 384-Well-Assay-Platten (#781866, Greiner, Kremsmünster, Österreich) in 10 %-FCS-Medium ausplattiert (Abbildung 5). Während der Applikation wurde die Zellsuspension in einer Spinnerflasche (#WITG5.529.002, VWR, Darmstadt, Deutschland) auf einem Magnetrührer (IKA® RCT Basic, IKA-Werke, Staufen in Breisgau, Deutschland) in Bewegung gehalten.

**Abbildung 5: Applikation der MDCKII-Zellen auf 384-Well-Assay-Platten.**

Während der Applikation der Zellen unter Verwendung des Multidrop Kombi Reagenzien-Dispensers wurden die Zellen auf einem Magnetrührer in Suspension gehalten.

Am nächsten Tag wurde Medium mittels CyBio Felix Liquid Handling-System (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) auf 1 % FCS-Medium umgesetzt, um das Überwachsen des dichten Zellrasens zu verhindern. 2 Tage nach dem Ausplattieren auf Assay-Platten konnten die Wirkstoffe aus der Wirkstoffkollektion in einer Konzentration von 1 µM aufgetragen werden. 24 h nach der Wirkstoffapplikation wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (#J61899.AK, VWR, Darmstadt, Deutschland) in DPBS (#14190-169, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) fixiert, anschließend mit 1x DPBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C in der Antiköperlösung mit primären Antikörpern inkubiert und 3-mal mit 1x DPBS abgewaschen. Die Lösung mit dem sekundären Antikörper wurde zusammen mit 0,4 mg/l DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und 3-mal mit 1x DPBS abgewaschen. Aufgrund der großen benötigten Volumina im Hochdurchsatz-Ansatz wurden die Antikörperverdünnungen auf ein Maximum erhöht (Tabelle 20).

Tabelle 20: Antikörper-Verdünnungen für den Lokalisations-Assay.

Antikörper	Verdünnung	Quelle
α-BEST1 (C2/C3)	1:250	Produziert von David Biotechnologie, Regensburg, Deutschland
α-CTNNB1	1:3.000	#610153, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	1:1.500	#A32740, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Goat anti-mouse Alexa Fluor 549	1:1.500	#A32742, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA

Die Applikation der Lösungen erfolgte jeweils mit CyBio Felix Liquid Handling-System (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) und die Waschschritte mit dem BioTek Microplatten-Washer (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland). Im 384-Well-Format erfolgte die mikroskopische Datenauslese der Platten direkt am Operetta® CLS High-Content Imaging System (PerkinElmer, Waltham, USA). Dabei wurden pro Fluoreszenz-Kanal jeweils 3 Bilder an unterschiedlichen Bereichen der Vertiefung bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.15 Datenanalyse und Graphische Darstellung

Daten wurden mit Harmony[®] (PerkinElmer, Waltham, USA), Igor Pro 8 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA), Microsoft Office (Microsoft, Redmond, WA, USA) und SigmaPlot Version 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) ausgewertet. Bilder bzw. Graphen wurden mit ImageJ 1.49 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) und CorelDRAW (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Charakterisierung von *BEST1*-exprimierenden Zellsystemen

Um die Basis für die Entwicklung von Wirkstoffscreening-Plattformen zu schaffen, wurden zwei *BEST1*-Zellsysteme generiert und charakterisiert: MDCKII-Zellen haben ihren Ursprung in caninen Epithelzellen der Niere und haben sich durch ihre Fähigkeit, polar zu wachsen, als exzellentes Modell für funktionelle Untersuchungen des *BEST1*-Chloridkanals erwiesen (Milenkovic et al., 2011; Milenkovic et al., 2018). HiRPE können als besonders wertvolles, natives System in der Untersuchung von M. Best eingesetzt werden, da sie aus Zellen gesunder Spender oder M. Best-Patienten hervorgehen und somit endogen normales oder mutantes *BEST1* exprimieren.

Diese *BEST1*-Zellsysteme wurden auf verschiedene, dem *BEST1*-Protein zugeschriebene Eigenschaften und Funktionen hin untersucht, um einen robusten M. Best-spezifischen Phänotyp zu identifizieren. Damit sollte eine Phänotyp-basierte Wirkstoffs-Screening-Plattform entwickelt werden.

3.1.1 Herstellung von stabil *BEST1*-exprimierenden MDCKII-Zelllinien

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit standen dem Institut für Humangenetik bereits 10 MDCKII-Zelllinien zur Verfügung (Milenkovic et al., 2011), die stabil normales oder mutiertes *BEST1* exprimieren (Tabelle 3). Dabei wurden *BEST1*-Mutationen gewählt, die gleichmäßig über die *BEST1*-Sequenz verteilt sind. Die Positionen der Mutationen im *BEST1*-Strukturmodell sind in Abbildung 6A dargestellt. Die Expression von *BEST1* in den generierten MDCKII-Zelllinien wurde mittels RT-PCR (Abbildung 6B) und Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 6C). Immunozytochemische Färbungen sind nachfolgend in Kapitel 3.1.3 gezeigt.

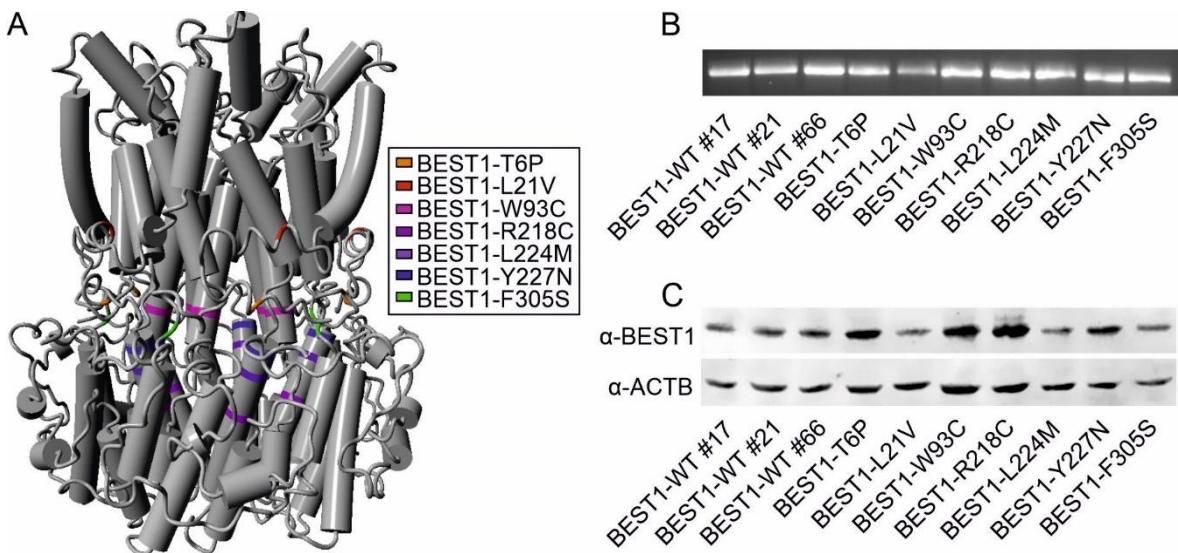


Abbildung 6: Lokalisation ausgewählter BEST1-Mutationen im 3D-Strukturmodell und BEST1-Expression in generierten MDCKII-Zelllinien.

7 krankheitsassoziierte Mutationen, die gleichmäßig über BEST1 verteilt sind, wurden ausgewählt. Wildtypische BEST1-Sequenzen wurden in pcDNA3 kloniert und Mutationen durch zielgerichtete Mutagenese erzeugt.

(A) Kristallstrukturmodell des homopentameren Hühnchen-BEST1-Chloridkanals (PDB code: 4RDQ) (Dickson et al., 2014). Die Positionen der M. Best-assoziierten BEST1-Mutationen sind farbig markiert.

(B) Expression von BEST1 durch RT-PCR der Gesamt-mRNA aus generierten MDCKII-Zelllinien.

(C) Western Blot-Bilder von Ganzzelllysaten aus generierten MDCKII-Zelllinien unter Verwendung des α-BEST1(C2/C3) -Antikörpers. Als Beladungskontrolle wurde α-β-Actin (ACTB) verwendet.

3.1.2 Generierung von Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zellkulturlinien

Es wurden 7 hiRPE-Zelllinien generiert. Zwei davon gehen auf Zellen gesunder Spender und 5 auf Zellen von M. Best-Patienten zurück (Tabelle 6).

Abbildung 7A zeigt die Anordnung der M. Best-assoziierten Mutationen im BEST1-Strukturmodell. Die BEST1-Expression der generierten hiRPE wurde durch RT-PCR-(Abbildung 7B) und Western Blot-Analyse (Abbildung 7C) bestätigt. Immunozytochemische Färbungen des BEST1 dieser Zelllinien werden in Kapitel 3.1.3 gezeigt.

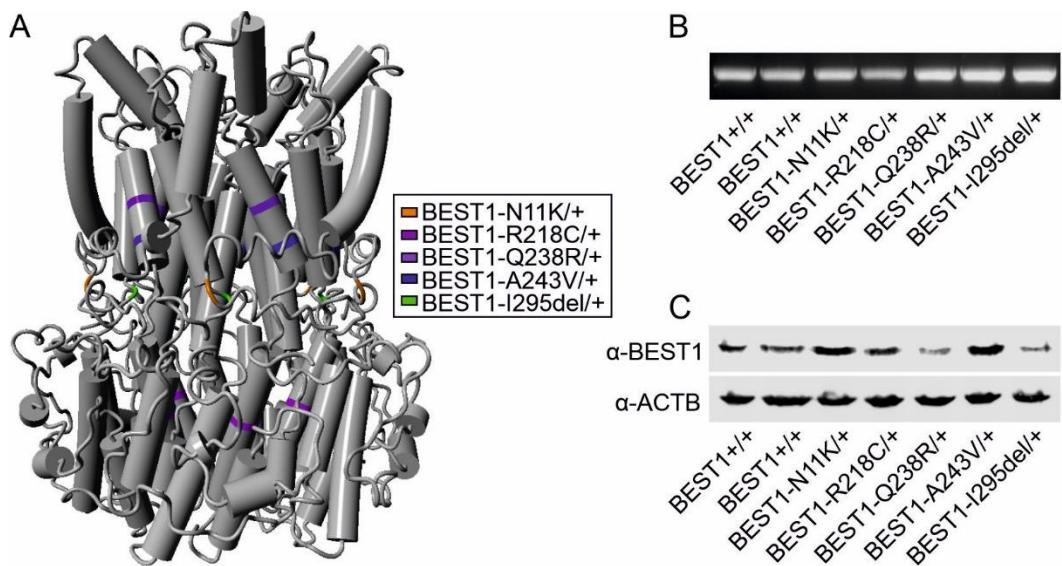


Abbildung 7: Lokalisation von BEST1-Mutationen rekrutierter M. Best-Patienten im 3D-Strukturmodell und *BEST1*-Expression in generierten hiRPE.

5 Patienten mit verschiedenen BEST1-Mutationen wurden rekrutiert. Es wurden aus Haut-Biopsien Fibroblasten kultiviert, in hiPSC rückprogrammiert und in hiRPE ausdifferenziert.

(A) Kristallstrukturmodell des homopentameren Hühnchen-BEST1-Chloridkanals (PDB code: 4RDQ) (Dickson et al., 2014). Die Positionen der M. Best-assoziierten BEST1-Mutationen sind farbig markiert.

(B) Expression von *BEST1* durch RT-PCR der Gesamt-mRNA aus generierten hiRPE.

(C) Western Blot-Bilder von Ganzzelllysaten aus generierten hiRPE unter Verwendung des α-BEST1(C2/C3)-Antikörpers. Als Beladungskontrolle wurde α-ACTB verwendet.

3.1.3 Untersuchung der BEST1-Proteinlokalisierung

Zur Bestimmung der zellulären BEST1-Lokalisation wurden die generierten MDCKII- und hiRPE-Zelllinien immunozytochemisch gefärbt. Dabei zeigte wildtypisches BEST1 eine membranständige Lokalisation, die als authentisch beschrieben wurde (Davidson et al., 2009; Davidson et al., 2011; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2014; Johnson et al., 2013). Dagegen waren 6 der 7 BEST1-Mutanten in den generierten MDCKII-Zelllinien überwiegend im Zytosplasma fehlge lokalisiert (Abbildung 8). Eine Ausnahme bildete BEST1-R218C, welches ähnlich dem wildtypischen BEST1 an der Plasmamembran verortet war.

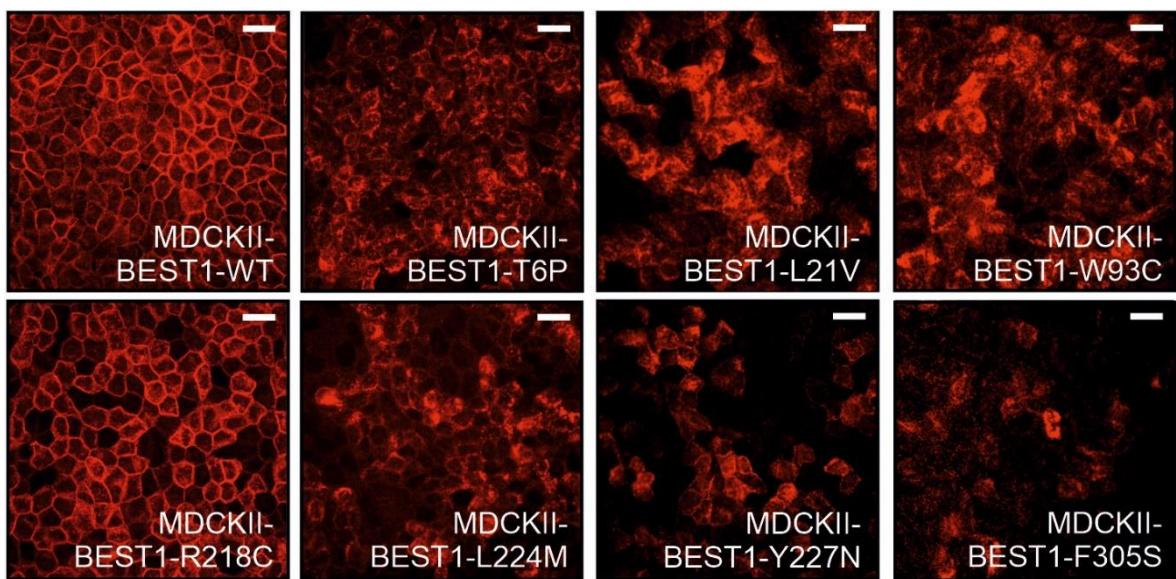


Abbildung 8: BEST1-Proteinlokalisierung im MDCKII-Zellsystem.

Stabile MDCKII Zelllinien wurden 7 Tage auf Deckgläsern polarisiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen immunozytochemisch gefärbt (rot = α -BEST1(C2/C3) -Antikörperfärbung). Maßstabsleisten: 20 μ m.

Auch bei immunozytochemischen Analysen der hiRPE-Zelllinien gesunder Spender wurde BEST1 an der Plasmamembran nachgewiesen. Zwei von fünf pathogenen BEST1-Varianten zeigten dagegen eine Fehllokalisation des BEST1 in den hiRPE-Zelllinien (Abbildung 9): BEST1-A243V war nur teilweise an der Plasmamembran, vor allem aber diffus im Zytoplasma verteilt. BEST1-Q238R war ausschließlich im Zytoplasma zu erkennen. Drei der generierten M. Best-assoziierten hiRPE-Zelllinien (hiRPE-BEST1-N11K/+; hiRPE-BEST1-R218C/+ und hiRPE-BEST1-I295del/+) wiesen hingegen eine, dem Wildtyp ähnliche, membranständige BEST1-Lokalisation auf.

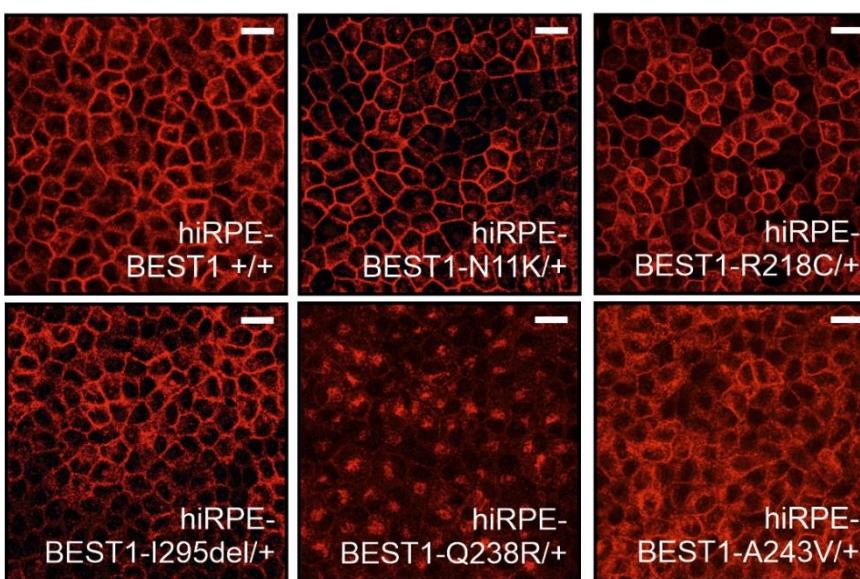


Abbildung 9: BEST1-Proteinlokalisierung in hiRPE.

HiRPE wurden 6 Wochen auf Transwell-Filtern polarisiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen immunozytochemisch gefärbt (rot = α -BEST1(C2/C3) -Antikörperfärbung). Maßstabsleisten: 20 μ m.

3.1.4 Untersuchung der BEST1-Kanalfunktion

BEST1 stellt einen funktionellen Chloridkanal dar (rezensiert von Hartzell et al., 2008; Li et al., 2017; Moshfegh et al., 2016; Milenkovic et al., 2015), ist jedoch auch permeabel für andere Halogenide wie Bicarbonat, Bromid, Iodid, Nitrat und Thiocyanat (Suzuki et al., 2006). Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um mittels eines fluoreszenzbasierten Assays die BEST1-Kanalfunktion zu untersuchen. Der entsprechende Halogenidtransport-Assay wurde erstmals zur Untersuchung des Chloridkanals CFTR (Galietta et al., 2001) beschrieben. Er basiert auf dem gelb-fluoreszierenden Biosensor YFP-H148Q/I152L, der sich durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Iodid auszeichnet (Jayaraman et al. 2000).

Um die BEST1-Kanalfunktion im MDCKII-Zellmodell zu messen, wurden alle generierten MDCKII-Zelllinien mit *YFP-H148Q/I152L* viral transduziert, sodass die Zellen hell und gleichmäßig fluoreszieren (Abbildung 10).

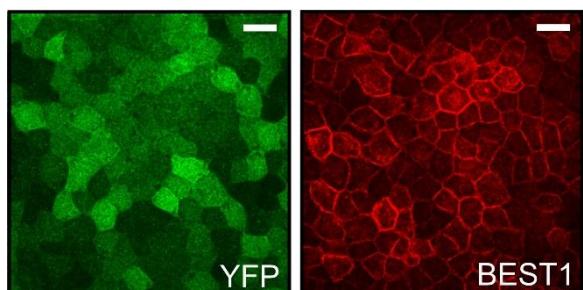


Abbildung 10: Intrazelluläre YFP-Expression in MDCKII-Zelllinien.

MDCKII-Zelllinien, die stabil *BEST1* tragen, wurden viral mit *YFP* transduziert. (grün =YFP-Autofluoreszenz; rot = α -BEST1(C2/C3) - Antikörperfärbung). Maßstabsleisten: 20 μ m.

Generell wird die YFP-Fluoreszenz in Anwesenheit von Iodid reversibel ausgelöscht (Abbildung 11A). Wird Iodid auf die BEST1- und YFP-exprimierenden MDCKII-Zellen appliziert, passiert Iodid die Plasmamembran durch geöffnete BEST1-Kanäle. Im Zytoplasma führt die Anwesenheit von Iodid zur Herabsetzung der YFP-Fluoreszenzintensität (Abbildung 11B). Je schneller die YFP-Fluoreszenz der Zellen ausgelöscht wird, desto größer ist demnach die BEST1-vermittelte Membrandurchlässigkeit. Auf diesem Prinzip basierend können am Plattenlesegerät YFP-Fluoreszenz-Veränderungen als Indikator für die BEST1-Kanalfunktion gemessen werden.

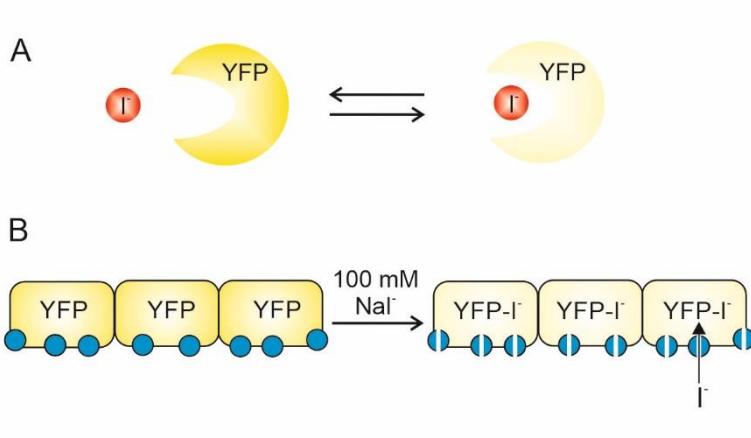


Abbildung 11: Graphische Darstellung des Halogenidtransport-Assay-Prinzips.

(A) Verringerung der Fluoreszenzintensität des YFP-Proteins durch Interaktion mit Iodid.

(B) Änderung der Fluoreszenzintensität von YFP und *BEST1* exprimierenden MDCKII-Zellen. Dringt durch *BEST1* (blau) Iodid in die Zelle, sinkt die YFP-Fluoreszenz der MDCKII-Zellen.

In 3 unabhängig generierten MDCKII-Zelllinien, die stabil normales *BEST1* exprimierten (MDCKII-BEST1-WT #17, #21, #66), konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten um bis zu 30 % beobachtet werden (Abbildung 12A). Im Gegensatz dazu sank die YFP-Fluoreszenz im gleichen Zeitraum (40 sec) bei MDCKII-Zellen, die mutiertes *BEST1* exprimieren (MDCKII-BEST1-L21V, MDCKII-BEST1-W93C, MDCKII-BEST1-R218C, MDCKII-BEST1-L224M) nur um ca. 10 % (Abbildung 12B). Der Rückgang der YFP-Fluoreszenzintensität der mutierten Zelllinien ging nicht über den Rückgang in MDCKII-Kontrollzellen, die kein *BEST1* exprimieren (MDCKII #8, #10, #27), hinaus.

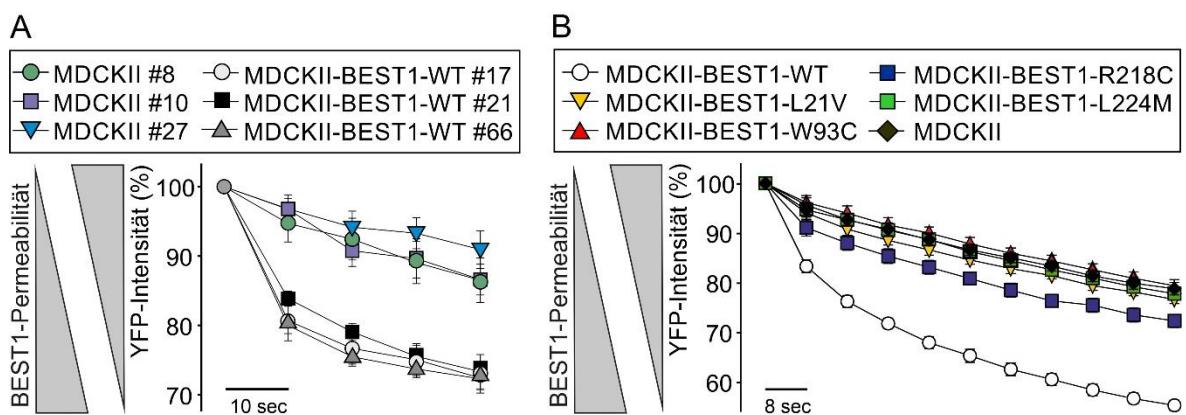


Abbildung 12: *BEST1*-Kanalfunktion in generierten MDCKII-Zelllinien anhand des Halogenidtransport-Assays.

Generierte MDCKII wurden 5 Tage polar kultiviert, bevor im Rahmen des Halogenidtransport-Assays Änderungen der YFP-Fluoreszenzintensitäten dieser Zellen am Plattenlesegerät aufgenommen wurden. Der Ausgangswert (= 100 %) wurde in 100 mM Chlorid gemessen. Der anschließende Rückgang der YFP-Fluoreszenzintensitäten wurde durch Iodid-Applikation initiiert. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben.

(A) Vergleich mehrerer unabhängiger Zelllinien, die entweder kein *BEST1* oder stabil-exprimierendes normales *BEST1* tragen ($n = 6$).

(B) Vergleich von Zellen, die kein *BEST1*, stabil-exprimierendes normales oder mutiertes *BEST1* tragen ($n = 6$).

Die BEST1-Kanalfunktion wurde zusätzlich zur indirekten, Fluoreszenz-basierten Messung auch mittels direkter Messung der Anionenströme untersucht. Es wurde eigens im Rahmen dieser Arbeit ein *Patch-Clamp*-Setup am Institut für Humangenetik installiert und etabliert. Versuche, die zur Etablierung der BEST1-Kanalaktivität, sowie zur generellen Etablierung der *Patch-Clamp*-Methode am Institut geführt haben, sind im Anhang abgebildet.

Durch die Etablierung dieser Methode war es möglich, *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration an hiRPE durchzuführen. So konnte in hiRPE bestätigt werden, dass M. Best-assoziiertes BEST1 im Vergleich zu normalem BEST1 signifikant reduzierte Anionenströme aufweist (Abbildung 13).

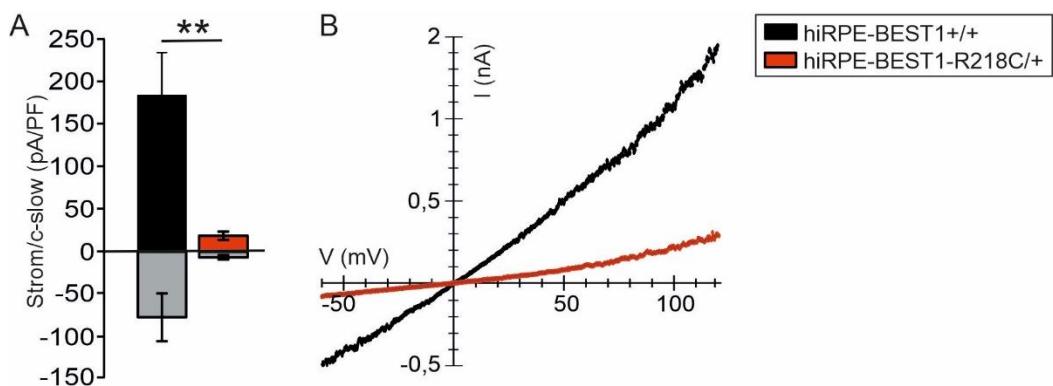


Abbildung 13: Analyse der BEST1-Kanalfunktion in hiRPE über *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration.

HiRPE wurden mit TrypLE aus dem Zellrasen gelöst, vereinzelt und auf Deckgläsern ausgesät, um *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration durchzuführen.

(A) Darstellung der maximalen Anionenströme bei +120 mV und -60 mV. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n = 8-10$). Sternchen markieren statistische Signifikanz (* $p < 0.05$) oder starke statistische Signifikanz (** $p < 0.01$) unter Verwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student-T-Tests.

(B) Repräsentative Darstellung der Strom-Spannungs-Amplituden.

Zusammenfassend konnte sowohl durch den Halogenidtransport-Assay als auch durch *Patch-Clamp*-Messungen eine reduzierte BEST1-Kanalfunktion in M. Best-assoziierten Ziellinien nachgewiesen werden. Ein Assay, der auf die BEST1-Kanalfunktion abzielt, ist demnach geeignet, einen robusten Krankheitsspezifischen Phänotyp zu beschreiben und entsprechend Modifikationen des Phänotyps in feiner Skalierung zu messen.

3.1.5 Untersuchung der POS-Degradation und Phagozytose-Aktivität

BEST1 wird eine entscheidende Rolle in RPE beim Abbau von POS zugeschrieben (Singh et al., 2013). Um den Einfluss von BEST1-Mutationen auf die Phagozytose in hiRPE zu untersuchen, wurden POS aus porzinen Retinae aufgereinigt und ins hiRPE-Medium appliziert. Mittels Western Blot-Analyse wurde intrazellularer POS-Abbau über einen Zeitraum von 8 h nach einmaliger Applikation und anschließendem gründlichen Abwaschen der nicht phagozytierten POS untersucht. Dabei wurde ein stetiger Abbau der POS über die Zeit beobachtet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der M. Best-assozierter Zelllinie und der Kontroll-Zelllinie (Abbildung 14).

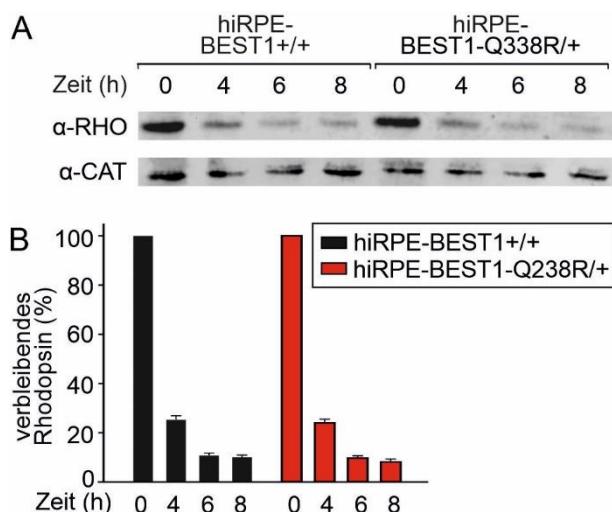


Abbildung 14: POS-Degradation in hiRPE. Es wurden POS auf hiRPE appliziert, 2 h inkubiert und anschließend nicht phagozytierte POS vom Zellrasen abgewaschen. Zellen wurden zu angezeigten Zeitpunkten geerntet, lysiert und Western Blot-Analysen unter Verwendung von Antikörpern gegen Rhodopsin (POS-Marker) unterzogen. Ein α-Katalase (CAT)-Western Blot wurde als Beladungskontrolle durchgeführt.
(A) Repräsentativer Western Blot.
(B) Quantitative Auswertung. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben ($n = 6$).

Um die Phagozytose-Aktivität von hiRPE im Detail zu untersuchen, wurden Zellen mit kommerziell erworbenen pHrodo® *E. coli* Bioparticles® behandelt. Deren Aufnahme in die Zelle kann durch pH-abhängige Fluoreszenz im InCucyte® Live-Cell-Analysesystem in Echtzeit verfolgt werden. Extrazellulär zeigen die Biopartikel kaum Fluoreszenz, doch bei Aufnahme in das saure Milieu der Lysosomen während der Phagozytose steigt die Fluoreszenz umgekehrt proportional zum pH-Wert. Dieser Phagozytose-Assay konnte hinsichtlich dreier Parameter analysiert werden: Anzahl, Fläche und Fluoreszenzintensität der aufgenommenen Biopartikel. In Bezug auf Anzahl und Fläche der Biopartikel war in den 2 getesteten Zelllinien ein stetiger Anstieg über die Zeit hinweg zu erkennen. Dabei gab es aber zwischen hiRPE-BEST1+/+ und hiRPE-BEST1-Q238R/+ keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15A-C). Hinsichtlich Fluoreszenzintensität der Biopartikel zeigte hiRPE-BEST1-Q238R/+ im Vergleich zu hiRPE-BEST1+/+ signifikant

geringere Werte ab 6 h mit steigender Tendenz über die Zeit (Abbildung 15D). Diese niedrigeren Intensitäten entsprechen einem erhöhten lysosomalen pH-Wert. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Lysosomen beider Zelllinien über die Zeit saurer werden, aber die M. Best-assoziierte Zelllinie einen höheren lysosomalen pH-Wert als die Zelllinie des gesunden Spenders aufweist.

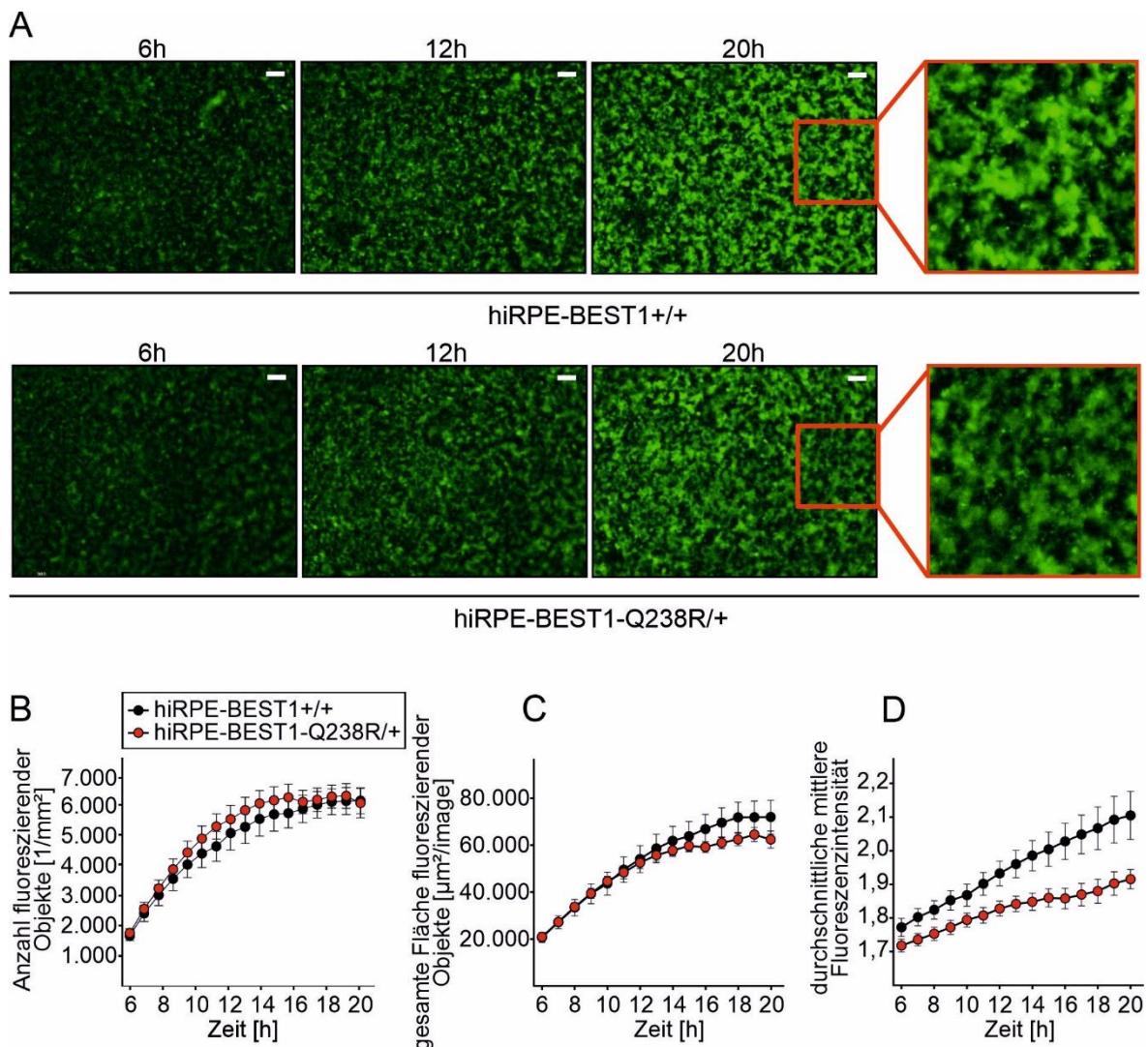


Abbildung 15: Biopartikel-Phagozytose in hiRPE.

Es wurden einmalig pHrodo® *E. coli* Bioparticles® auf hiRPE-Zellkulturen gegeben, die bereits 6 Wochen auf Transwell-Filters polarisiert wurden. Die Aufnahme in das saure Milieu der Lysosomen in einem Zeitraum von 6 bis 20 h nach Applikation wurde im InCucyte® verfolgt.

(A) Repräsentative Mikroskopiebilder der hiRPE mit fluoreszierenden Biopartikeln. Maßstabsleisten: 20 µm.

(B) Quantitative Analyse der Anzahl fluoreszierender Objekte. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben ($n = 16$).

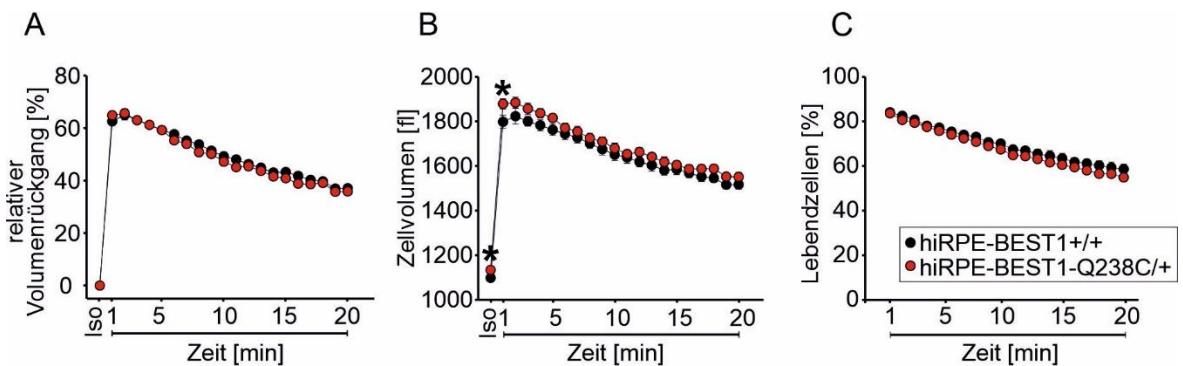
(C) Quantitative Analyse der Fläche der Biopartikel-Objekte im Zeitverlauf. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben ($n = 16$).

(D) Quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben ($n = 16$).

Generell konnten folglich keine Effekte von BEST1-Mutationen auf die POS-Degradation und Phagozytose-Aktivität in hiRPE detektiert werden. Jedoch zeigten M. Best-assoziierte hiRPE im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien einen alkalischeren lysosomalen pH-Wert nach Biopartikel-Phagozytose. Aufgrund der hohen Kosten der verwendeten Biopartikel war dieser Assay aber nicht geeignet, eine skalierbare Screening-Plattform zu etablieren und diesen Phänotyp zu targetieren.

3.1.6 Untersuchung der Zellvolumina und Volumenregulation

Die Fähigkeit, nach hypoosmotischem Stress das erhöhte Zellvolumen zu regulieren, ist ein physiologischer Prozess jeder Zelle (rezensiert von Lang et al., 1998). Eine Eigenschaft, die BEST1 zugeschrieben wird, besteht in dieser Volumenregulation (Marmorstein et al., 2015; Milenkovic et al., 2015). Um dies in hiRPE zu untersuchen, wurden Zellen mit hypoosmotischer Lösung (Δ 90 mosmol/kg) zum Anschwellen gebracht. Volumenmessungen von Zellsuspensionen wurden in Zeitverlaufsexperimenten unter Verwendung eines CASY®-Zellzählers durchgeführt. Diese Technik ermöglicht die genaue Messung von Änderungen des Zellvolumens in einem Live-Szenario. Der Rückgang der Schwellung über die Zeit wird in Abbildung 16 dargestellt. In der Volumenregulationsabnahme gab es keinen Unterschied zwischen Kontroll-Zelllinie und der Patienten-Zelllinie (Abbildung 16A). Allerdings ist zu erkennen, dass der Ausgangswert des Zellvolumens in hiRPE-BEST1+/+ signifikant größer war als in hiRPE-BEST1-Q238R/+ (Abbildung 16B). Während des Abschwellens ist ein Rückgang an lebenden Zellen zu erkennen, der sich aber nicht zwischen den verschiedenen Zelllinien unterschied (Abbildung 16C).

**Abbildung 16: Zellvolumenregulation in hiRPE.**

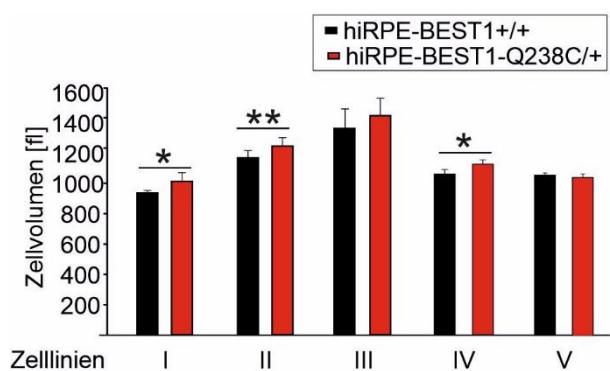
Zellen wurden zur Equilibrierung 30 min in isoosmotischer Lösung inkubiert. Daraufhin wurde der Zellvolumen-Ausgangswert aufgezeichnet (angezeigt durch ISO) und hiRPE anschließend in hypoosmotische Lösung ($\Delta 90$ mosmol/kg) aufgenommen. Werte wurden unter Verwendung eines CASY®-Zellzählers erfasst. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n = 15$).

(A) Relative Werte der Zellvolumenregulation nach hypoosmotischer Stimulation.

(B) Absolute Werte der Zellvolumenregulation nach hypoosmotischer Stimulation (* $p < 0,05$; unter Verwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student-T-Tests).

(C) Prozentuale Werte der Lebendzellen nach hypoosmotischer Stimulation.

Nachfolgend wurde der Zellvolumen-Ausgangswert in isoosmotischer Lösung für mehrere unabhängige hiRPE-Linien einer Mutation (BEST1-Q238R/+) mit jeweils einer hiRPE-Linie mit normalem BEST1 (BEST1+/+) verglichen (Abbildung 17). Die jeweils 5 Zelllinien wurden unabhängig voneinander aufgetaut, kultiviert und gemessen. In 3 von 5 Zelllinien-Vergleichen waren hiRPE-BEST1-Q238R/+ signifikant größer, als hiRPE-BEST1+/+ (Linie I, II und IV). In Linie III und IV war jedoch kein Unterschied im Zellvolumen zwischen den Zelllinien erkennbar.

**Abbildung 17: Zellvolumina der hiRPE.**

Jeweils 5 Sätze an hiRPE-Linien wurden unabhängig voneinander aufgetaut, kultiviert und gemessen. Zellen wurden zur Equilibrierung 30 min in isoosmotischer Lösung inkubiert und deren Zellvolumina mittels CASY®-Zellzähler ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n = 15$). Sternchen markieren statistische Signifikanz (* $p < 0,05$) oder starke statistische Signifikanz (** $p < 0,01$) unter Verwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student-T-Tests.

Grundsätzlich konnte mithilfe dieser Methode kein Einfluss von BEST1 auf die Zellvolumenregulation gezeigt werden. Bezuglich der Grundvolumina nicht stimulierter Zellen wurden teilweise Unterschiede im Volumen zwischen hiRPE eines gesunden Spenders und eines M. Best-Patienten beobachtet. Jedoch waren

diese Effekte nicht stabil und damit nicht reproduzierbar, sodass dieser Phänotyp nicht im Rahmen eines Wirkstoffscreens adressiert werden konnte.

3.2 Entwicklung skalierbarer Wirkstoffscreening-Plattformen

Ein M. Best-spezifischer Phänotyp wurde bei der Charakterisierung der BEST1-Zellsysteme sowohl bzgl. der BEST1-Lokalisation als auch der BEST1-Kanalfunktion identifiziert. Um die Frage zu klären, ob auf der Basis dieser Phänotypen ein HTS entwickelt werden kann, wurde deren Stabilität und Replizierbarkeit getestet. Anschließend wurden die zugrundeliegenden Assays zur Anwendung im Hochdurchsatz auf 384- bzw. 96-Well-Formate angepasst.

Wenngleich die beschriebenen Phänotypen in beiden generierten Zellsystemen (MDCKII und hiRPE) detektiert wurden, eigneten sich MDCKII-Zelllinien durch ihre entscheidend kostengünstigere Kultivierung bedeutend besser für die Entwicklung von Hochdurchsatz-Plattformen. In der Konsequenz wurde das MDCKII-Zellsystem ausgewählt, um nach Wirkstoffen zu suchen, die eine Verbesserung der mutierten BEST1-Lokalisation und -Kanalfunktion bewirken.

3.2.1 Entwicklung einer Lokalisations-Assay-Plattform im 384-Well-Format

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben fehllokalierten einige der untersuchten pathogenen BEST1-Varianten in bisher nicht charakterisierten Zellkompartimenten des Zytosplasmas und waren nicht wie wildtypisches BEST1 an der Plasmamembran verortet. Ziel dieser Arbeit war es, darauf aufbauend einen Assay zu entwickeln, mithilfe dessen klar zwischen membranständigen und fehllokaliisiertem BEST1 unterschieden werden kann. Durch eine automatisierte, skalierbare Assay-Plattform sollte die Suche nach einem BEST1-Korrektorkandidaten ermöglicht werden, der mutantes BEST1 an die Zellmembran bringt.

Die Lokalisations-Assay-Plattform wurde in enger Zusammenarbeit mit der „Hochdurchsatz-Drug- und -Target-Discovery“-Gruppe (Dr. Kamran Honarnejad) der Fraunhofer Gesellschaft ITEM Regensburg entwickelt. Mithilfe deren HTS-spezifischer Geräte und Software wurde die Handhabung der Zellen im 384-Well-Format, sowie das Auslesen und die Analyse der Assay-Daten umgesetzt.

Um die Stabilität und Reproduzierbarkeit und damit die Eignung zum Wirkstoffscreening dieses M. Best-spezifischen Phänotyps zu untersuchen, wurde die BEST1-Lokalisierung mehrerer unabhängiger MDCKII-Zelllinien untersucht. Die Zelllinien wurden gesondert aufgetaut und kultiviert. Dabei zeigte die wildtypische Zelllinie MDCKII-BEST1-WT über alle 5 Zelllinien hinweg eine robuste Lokalisation von BEST1 an der Plasmamembran. Als Beispiel für eine mutierte Zelllinie wurde MDCKII-BEST1-L224M ausgewählt, welche in allen untersuchten, unabhängigen Zelllinien eine ähnliche BEST1-Lokalisierung, jedoch im Zytoplasma und nicht an der Plasmamembran (Abbildung 18) zeigte.

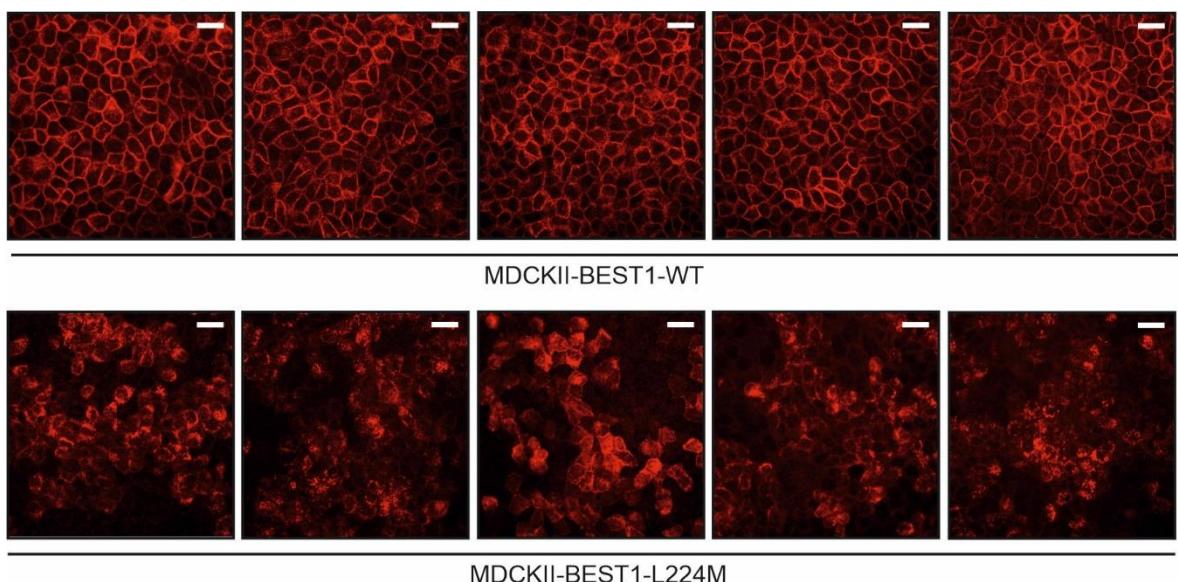


Abbildung 18: Wildtypische und mutierte BEST1-Lokalisation über mehrere, unabhängige MDCKII-Zelllinien hinweg.

MDCKII-Zelllinien, die stabil BEST1-WT oder BEST1-L224M exprimieren, wurden 5 Tage auf 1 %-FCS-haltigem Medium gehalten, um sie zu polarisieren. Nach der Fixierung wurden die Zellen immunozytochemisch gefärbt (rot = α -BEST1(C2/C3) -Antikörperfärbung). Die einzelnen Mikroskopiebilder stammen von 5 unabhängig voneinander aufgetaut und kultivierten Zelllinien, Maßstabsleisten: 20 μm .

Die stabil gleichbleibende BEST1-Lokalisation und die diesbezüglichen eindeutigen und robusten Unterschiede zwischen BEST1-WT und BEST1-L224M ermöglichen die Entwicklung eines skalierbaren Assays. Dieser Assay soll genutzt werden, um nach Wirkstoffen zu suchen, welche die Lokalisation von mutiertem BEST1 korrigieren und letztlich BEST1-L224M an die Plasmamembran bringen. Eine möglichst effektive Wirkstoffsuche sollte skalierbar sein und in einem Hochdurchsatz-geeigneten Format erfolgen. Dazu wurde der BEST1-

Lokalisations-Assay bzgl. Zellkulturbedingungen und immunozytochemischen Färbungen optimiert und in ein 384-Well-Format überführt (Abbildung 19).

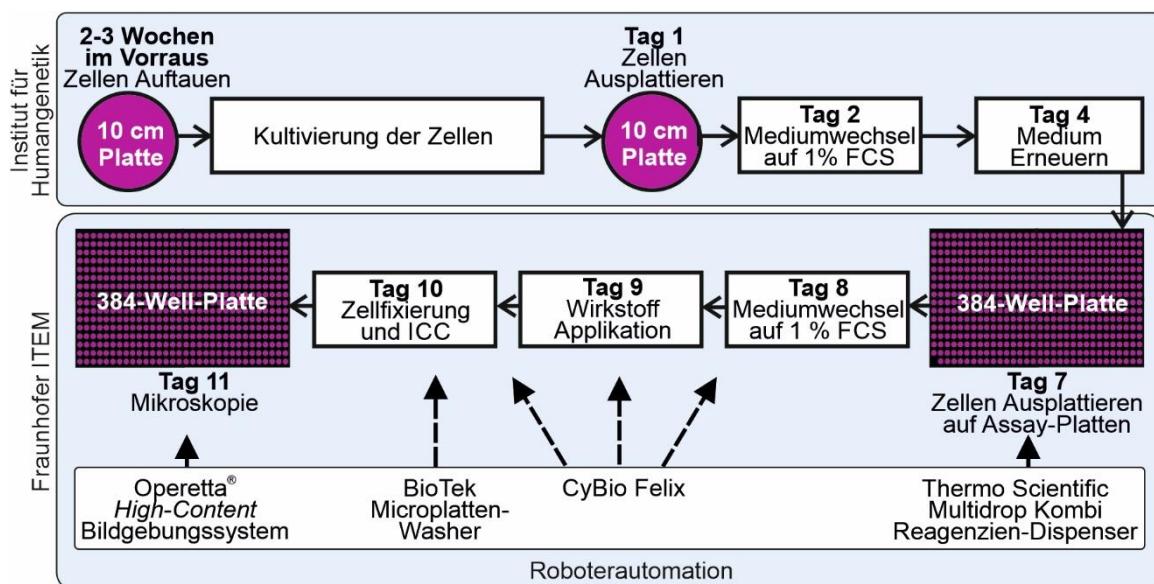


Abbildung 19: Aufbau der Hochdurchsatz-geeigneten Lokalisations-Assay-Plattform.

MDCKII-Zellen wurden 2 bis 3 Wochen lang kultiviert, bevor sie von Tag 1 bis 7 vorpolarisiert wurden. Am Fraunhofer ITEM wurde die Zellkultur unter Anwendung von Roboterautomation ins 384-Well-Format übertragen. An Tag 9 wurden Wirkstoffe appliziert und die Zellen 24 h später als Vorbereitung zur immunozytochemischen Färbung fixiert. Die Aufnahme und Auswertung der Mikroskopiebilder erfolgte durch das Operetta® Bildgebungssystem.

Der Aufbau der Lokalisations-Assay-Plattform stellte sich folgendermaßen dar: Zellen wurden 2 bis 3 Wochen im Voraus aufgetaut, um eine stabile Proliferationsrate zu gewährleisten. Für eine authentische membranständige Lokalisation von normalem BEST1 war eine Polarisierung der Zellen nötig. Diese wurde standartmäßig durch 5-tägige Kultivierung in 1 %-FCS-haltigen Medium erreicht. Um jedoch einen aufwendigen und kostenintensiven Mediumwechsel-Schritt im 384-Well-Assay-Format einzusparen, wurden die Zellen von Tag 1 bis 7 auf 10 cm-Zellkulturschalen vorpolarisiert. Dadurch verkürzte sich die Polarisierung der Zellen auf den 384-Well-Assay-Platten auf 3 Tage und ein Mediumwechsel war nicht mehr erforderlich. Die Zellen wurden an Tag 7 auf 384-Well-Assay-Platten ausgesät und an Tag 9 mit den zu testenden Wirkstoffen behandelt. Nach 24-stündiger Wirkstoffbehandlung wurden die Zellen an Tag 10 fixiert und angefärbt. DAPI markierte die Zellkerne und durch Antikörper wurden BEST1 und β-Catenin (CTNNB1) als Plasmamembranmarker gefärbt. Die Kultivierung und Vorpolarisierung der Zellen bis Tag 7 wurde am Institut für Humangenetik vorgenommen.

Zur Auswertung der erzeugten Mikroskopiebilder wurde folgende Bildanalyse entwickelt (Abbildung 20): Mittels DAPI-Nukleus-Färbung konnten Nuklei in Segmente eingeteilt werden. Die CTNNB1-Färbung wurde invertiert und ermöglichte es, einzelne Zellen in Segmente einzuteilen. Beide Segmentierungen zusammen ließen die Unterscheidung von Plasmamembran und Zytoplasma zu.

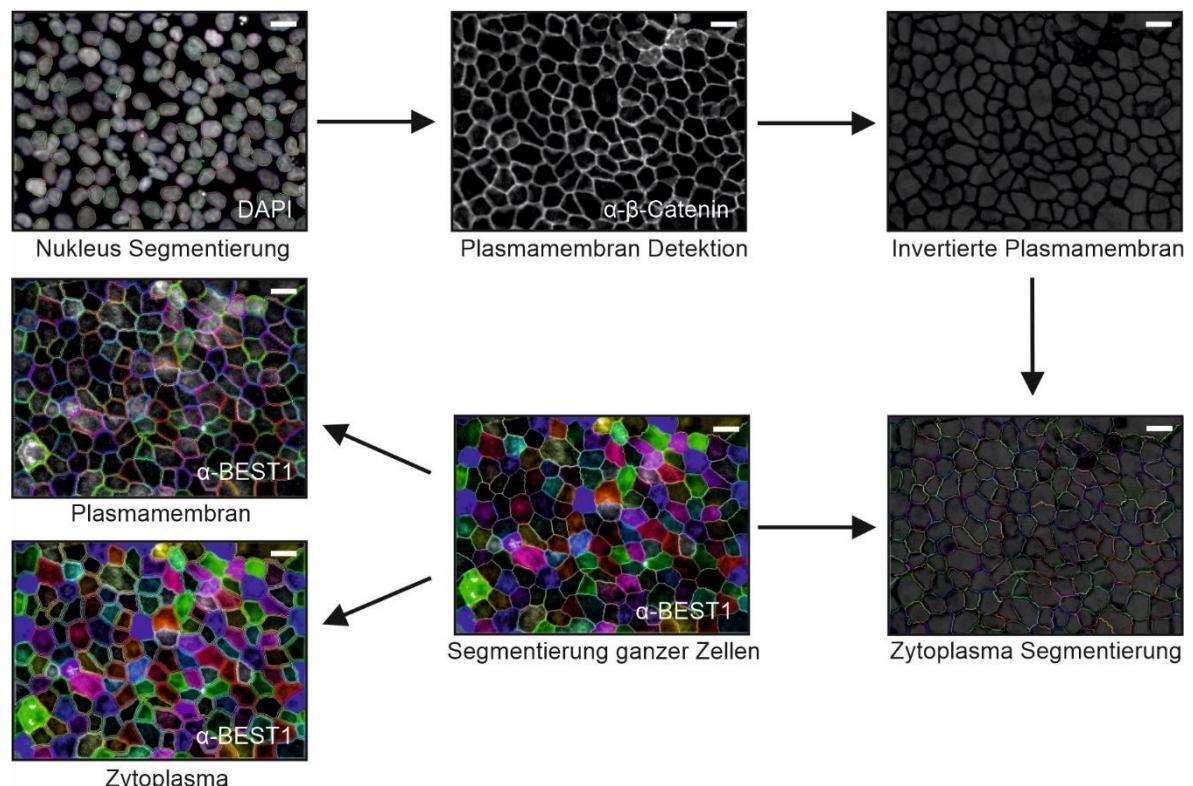


Abbildung 20: Verfahren zur Bildanalyse der Lokalisations-Assay-Plattform.

Polarisierte MDCKII-Zellen wurden im 384-Well-Format fixiert und immunozytochemisch mit α -CTNNB1-Antikörper und α -BEST1(C2/C3)-Antikörper gefärbt. Die Nuklei wurden mit DAPI markiert. Jedes erkannte Segment wird in einer eigenen Farbe dargestellt. Maßstabsleisten: 20 μm . (Abbildung entstanden in Kooperation mit Dr. Kamran Honarnejad, Fraunhofer Gesellschaft ITEM, Regensburg)

Auf der Grundlage dieser Bildanalyse wurde die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma im Vergleich zur Plasmamembran ins Verhältnis gesetzt, wodurch Zellen mit wildtypischer von Zellen mit mutierter BEST1-Lokalisation unterschieden werden konnten (Abbildung 21).

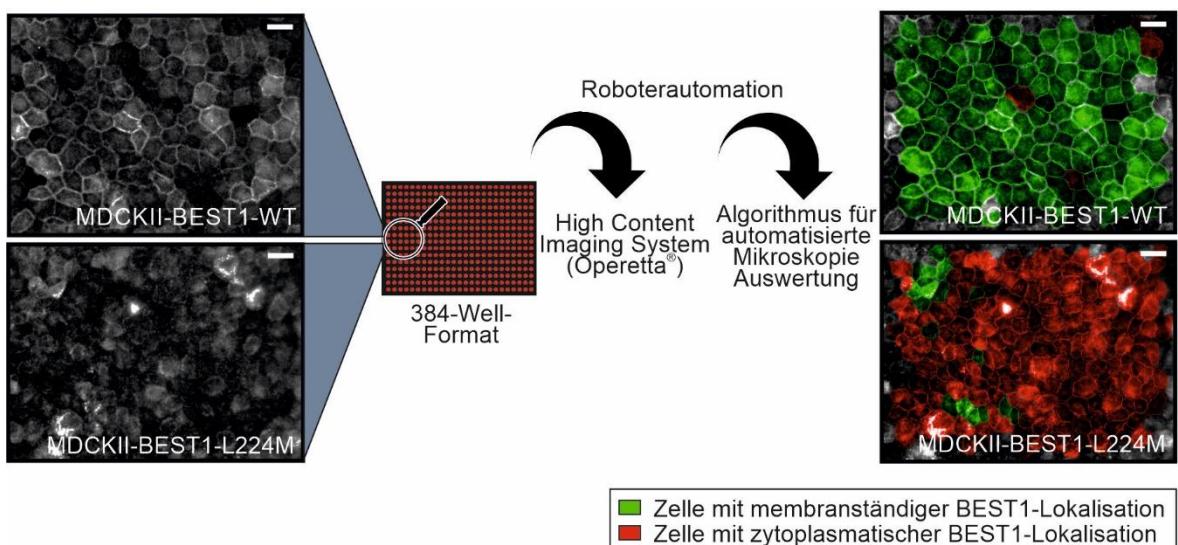


Abbildung 21: Roboterautomatisierte Unterscheidung von Zellen mit wildtypischer und mutanter BEST1-Lokalisation im 384-Well-Format.

MDCKII-BEST1-WT und MDCKII-BEST1-L224M wurden polarisiert, fixiert und immunozytochemisch mit α -BEST1(C2/C3)-Antikörper gefärbt. Maßstabsleisten: 20 μ m.

In der Konsequenz wurde erfolgreich eine skalierbare Screening-Plattform auf Basis der BEST1-Lokalisation entwickelt. Möglicherweise wurde dies durch die stabile BEST1-Lokalisation des normalen und mutantem BEST1 in MDCKII-Zelllinien und die dadurch realisierbare Überführung des BEST1-Lokalisations-Assays ins 384-Well-Format. Durch die Generierung eines Algorithmus konnten Zellen mit wildtypischer Lokalisation von Zellen mit mutanter BEST1-Lokalisation eindeutig und automatisiert unterschieden werden.

3.2.2 Entwicklung einer Halogenidtransport-Assay-Plattform im 96-Well-Format

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, wurde ein M. Best-assozierter Phänotyp bzgl. BEST1-Kanalfunktion in den generierten MDCKII-Zelllinien identifiziert. Es sollte eine Plattform entwickelt werden, um einen BEST1-Potentiator zu detektieren, der die Kanalfunktion von mutantem BEST1 wiederherstellt. Dazu sollte ein Assay etabliert werden, der verlässlich normale BEST1-Kanalfunktion von reduzierter, mutanter BEST1-Kanalfunktion unterscheidet. Der dafür verwendete Halogenidtransport-Assay ist generell gut für die HTS-Anwendung geeignet (Sui et al., 2010) und zeichnete sich auch im Rahmen dieser Arbeit durch stabile Reproduzierbarkeit aus. So wurden mehrere Zelllinien unabhängig voneinander

aufgetaut, kultiviert und mittels Halogenidtransport-Assay untersucht. MDCKII-BEST1-WT zeigte durchgehend eine stärkere Reduktion der YFP-Intensitäten und damit höhere Kanalpermeabilität als MDCKII-BEST1-R218C (Abbildung 22). MDCKII-BEST1-R218C wurde exemplarisch für eine Patienten-abgeleitete BEST1-Zelllinie gewählt. Dabei zeigt BEST1-R218C eine normale, membranständige Lokalisation, jedoch verringerte Kanalpermeabilität. Es liegt demnach keine Störung im BEST1-Proteintransport vor; vielmehr scheint die Ursache der Erkrankung in der reduzierten Kanalfunktion zu liegen. Somit ist BEST1-R218C optimal geeignet zum Einsatz bei der Suche nach einem *Potentiator*-Molekül, der die BEST1-Kanalfunktion verbessern soll.

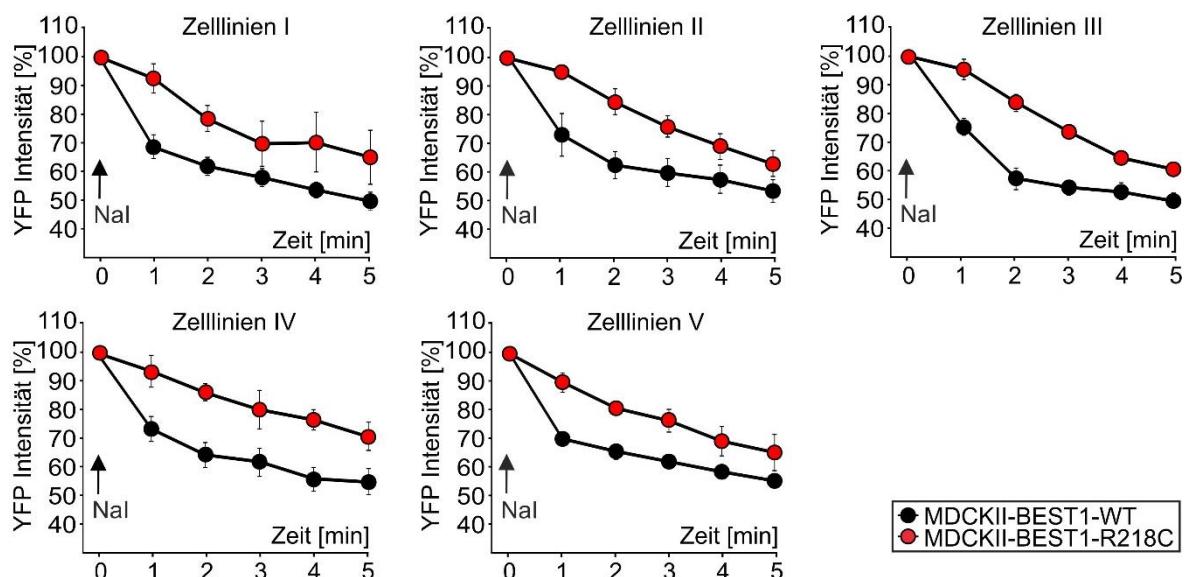


Abbildung 22: BEST1-Halogenidtransport in mehreren, unabhängigen MDCKII-Zelllinien.
MDCKII-BEST1-WT und MDCKII-BEST1-R218C wurden mit YFP transfiziert und zur Polarisierung 5 Tage im dichten Zellrasen kultiviert. Anschließend wurde die Iodid-induzierte YFP-Fluoreszenz-Reduktion am Plattenlesegerät aufgezeichnet. Jeder Graph steht für jeweils einen Satz unabhängig kultivierter Zelllinien. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n = 10$).

Um den Halogenidtransport-Assay auch für ein Hochdrucksatz-Screening verwenden zu können, wurde er im 96-Well-Format etabliert (Abbildung 23): Generierte MDCKII-Zelllinien wurden aufgetaut und 2 Wochen in Kultur gehalten, um eine stabile Proliferationsrate zu gewährleisten. An Tag 1 wurden die Zellen auf 96-Well-Assay-Platten aufgebracht. Das Medium wurde an Tag 2 von 20 % auf 1 % FCS gewechselt, um das Überwachsen des einschichtigen Zellrasens zu verhindern. Am 4. Tag wurde frisches Medium appliziert. Nach 24-stündiger Wirkstoffbehandlung wurde am Plattenlesegerät die Iodid-induzierte Reduktion der YFP-Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet.

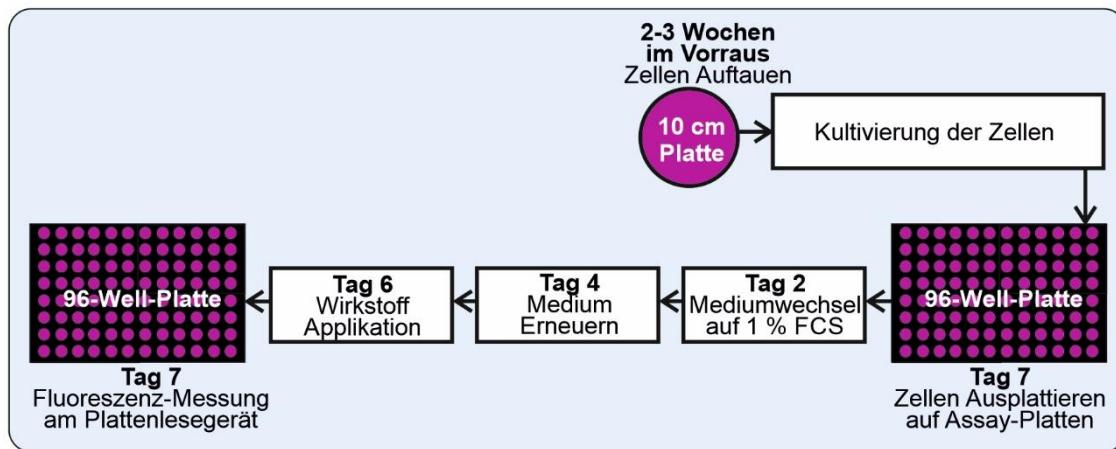


Abbildung 23: Aufbau der Hochdurchsatz-geeigneten Halogenidtransport-Assay-Plattform. MDCKII-Zellen wurden 2 bis 3 Wochen lang kultiviert und dann auf 96-Well-Assay-Platten ausplattiert. Nach 5-tägiger Polarisierung, wurden die Wirkstoffe appliziert und 24 h später erfolgten die Fluoreszenz-Messungen unter Iodid-Zugabe am Plattenlesegerät.

Zur einfacheren Analyse der YFP-Intensitäten im 96-Well-Format wurde nicht der zeitliche Verlauf der YFP-Änderung, sondern die YFP-Intensitäten zum Zeitpunkt der größten Differenz zwischen MDCKII-BEST1-WT und MDCKII-BEST1-R218C (60 sec nach Iodid-Applikation) dargestellt. So konnte in einem Graph die YFP-Fluoreszenz aller Vertiefungen (engl. well) einer 96-Well-Platte verglichen werden (Abbildung 24).

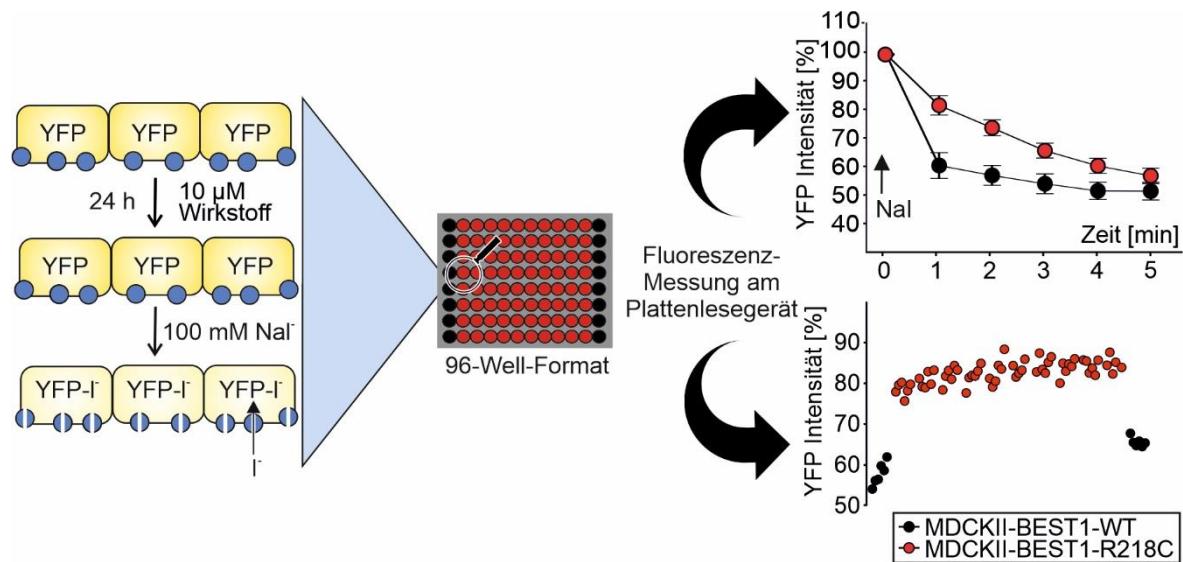


Abbildung 24: Prinzip des Aufbaus und der Analyse der BEST1-Kanalfunktion mittels Halogenidtransport-Assay.

MDCKII-Zelllinien, die YFP und BEST1 co-exprimieren, wurden 5 Tage lang auf 96-Well-Assay-Platten kultiviert. Nach Zugabe der zu testenden Wirkstoffe wurde die YFP-Fluoreszenzauslöschung durch Applikation einer Iodid-haltigen Lösung induziert. Jede Vertiefung der Platte wurde mit einem anderen Wirkstoff behandelt und die YFP-Intensitäten 60 sec nach dem Aufbringen von Iodid analysiert (blaue Kreise = BEST1-Kanal).

Zusammenfassend war durch den stabil auftretenden M. Best-spezifischen Phänotyp bzgl. Kanalpermeabilität die Etablierung des Halogenidtransport-Assays im 96-Well-Format möglich. Die Analyse des Assays erfolgte durch den Vergleich der YFP-Fluoreszenzreduktion 60 sec nach Iodid-Applikation. Dabei zeigte MDCKII-BEST1-R218C verlässlich über alle Proben der 96-Well-Platten hinweg geringere YFP-Fluoreszenzintensität als MDCKII-BEST1-WT. Folglich konnte eine skalierbare Screening-Plattform erfolgreich auf der Basis der Analyse des Halogenidtransports entwickelt werden.

3.3 Wirkstoffscreenings

Durch die Detektion robuster M. Best-spezifischer Phänotypen (Kapitel 3.1) und der Entwicklung entsprechender skalierbarer Assay-Plattformen (Kapitel 3.2), wurde ein Wirkstoffscreening im 384- bzw. 96-Well-Format ermöglicht. Es wurden kommerziell erworbene Wirkstoffkollektionen mittels Lokalisation-Assay auf BEST1-Korrektoren und mittels Halogenidtransport-Assay auf BEST1-Potentiatoren hin durchsucht.

3.3.1 Screening einer Kollektion von 2.645 Wirkstoffen mittels Lokalisations-Assay-Plattform und Validierung der Wirksamkeit potentieller BEST1-Korrektoren

Die Lokalisations-Assay-Plattform wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben im HTS-geeigneten 384-Well-Format etabliert. Auf dieser Grundlage wurde nachfolgend eine kommerziell erworbene Wirkstoffkollektion (Bioactive Compound Library, Selleckchem) mit 2.645 bioaktiven Wirkstoffen auf potentielle BEST1-Korrektoren hin getestet. Pro Vertiefung auf der 384-Well-Platte wurde ein Wirkstoff in der Konzentration von 1 µM auf MDCKII-BEST1-L224M appliziert. Nach 24-stündiger Wirkstoffbehandlung wurde durch immunozytochemische Färbung die BEST1-L224M-Lokalisation analysiert. Mikroskopiebilder wurden mittels oben exakt beschriebenen Algorithmus (Kapitel 3.2.1) ausgewertet und für jede Vertiefung auf der 384-Well-Platte und damit für jeden Wirkstoff ein Wert ermittelt, der den Anteil von Zellen im Bildausschnitt beschreibt, die nach der Wirkstoffbehandlung eine membranständige BEST1-Lokalisation aufwiesen. Es wurde ein Schwellenwert bei 20 % Anteil an Zellen mit membranständiger BEST1-Lokalisation gesetzt. 72

Wirkstoffe erzielten in mindestens 2 von 4 Replikaten einen Wert größer als 20 % und wurden somit als positive Treffer dokumentiert (Abbildung 25).

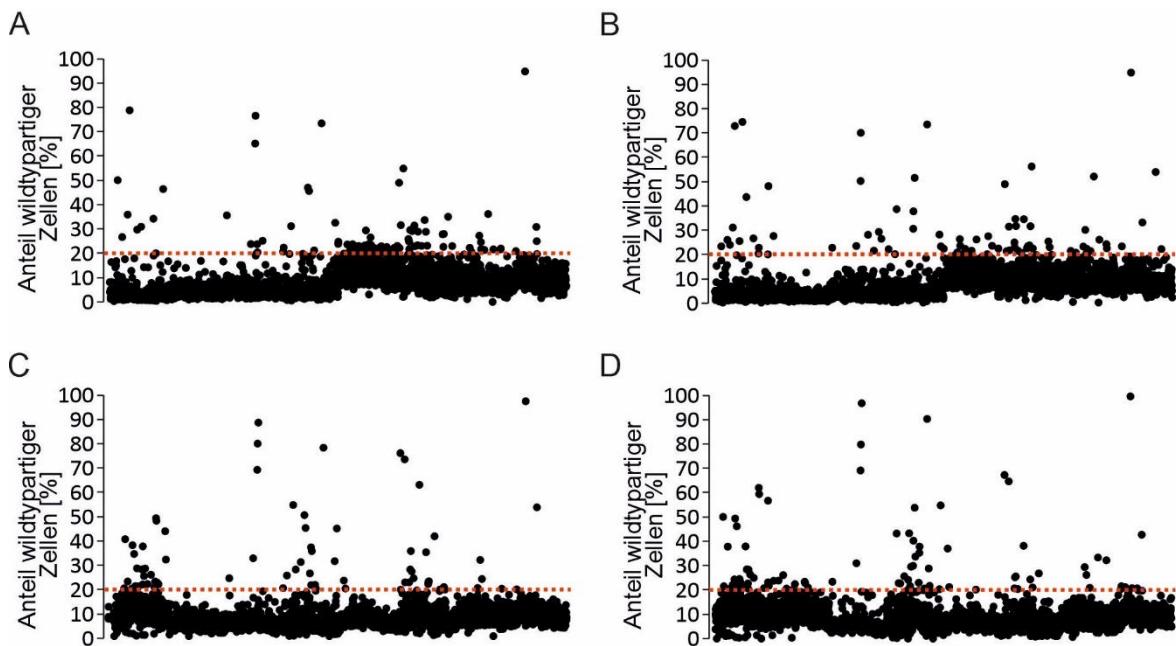


Abbildung 25: Primäres Screening der 2.645 Wirkstoff-Kollektion über die Lokalisations-Assay-Plattform.

MDCKII-BEST1-L224M wurden vorpolarisiert, auf 384-Well-Platten ausgesät und nach 2 Tagen mit 1 μ M Wirkstoff behandelt. Nach 24-stündiger Wirkstoffinkubation wurden die Zellen fixiert und der Zellkern, die Plasmamembran und BEST1 angefärbt, bevor durch Operetta[®] die Zellen aufgenommen und ausgewertet wurden. Mittels Algorithmus wurde der prozentuale Anteil Plasmamembran-ständiger Zellen im aufgenommenen Bildausschnitt der jeweiligen Vertiefung der 384-Well-Platte ermittelt. Ein Punkt steht für eine Vertiefung und damit für einen Wirkstoff.

(A-D) Jeder Graph stellt eins der vier unabhängigen Replikate dar (rote gepunktete Linie: Schwellenwert).

Um die Ergebnisse der Computer-gestützten Auswertung zu verifizieren, wurde das Bildmaterial einer individuellen optischen Kontrolle unterzogen (Abbildung 26). 2 der Treffer konnten eindeutig ausgeschlossen werden, weil sie toxisch auf den Zellrasen wirkten und nach 24-stündiger Inkubation zum Ablösen der Zellen geführt hatten. So wurden nur noch einzelne leuchtende Zellen in der Plattenvertiefung detektiert (Abbildung 26B). 33 der 72 Treffer zeigten zwar Veränderungen der BEST1-L224M-Lokalisation, jedoch war hier BEST1 eher intrazellular und weniger an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 26C). 37 der 72 Treffer zeigten nach Wirkstoffbehandlung tatsächlich eine vielversprechende, membranständige BEST1-Lokalisation, ähnlich der des normalen BEST1 (Abbildung 26A und D).

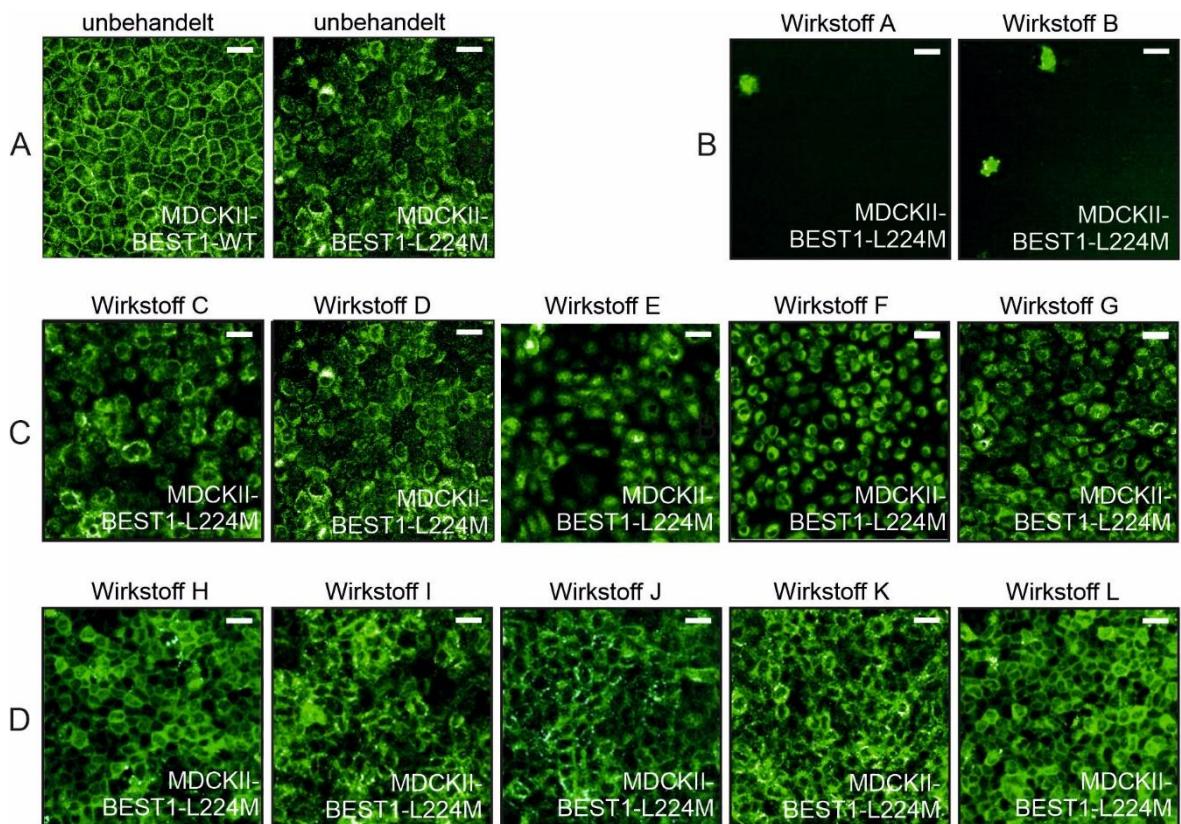


Abbildung 26: Lokalisation vom mutierten BEST1 nach Behandlung mit positiven Treffern des primären Screenings bzgl. eines BEST1-Korrektors.

MDCKII wurden 24 h mit 1 µM Wirkstoff aus der Kollektion behandelt, fixiert und immunozytochemisch gefärbt (grün = α-BEST1(C2/C3) -Antikörperfärbung). Maßstabsleisten: 20 µm.

(A) Dargestellt sind unbehandelte Kontrollen.

(B) Zwei Wirkstoffe führten zwar zu einem positiven Ausschlag des Algorithmus, hatten aber ein Ablösen des Zellrasens bewirkt.

(C) Es sind Beispiele aus 33 Wirkstoffen gezeigt, die zwar zu einem positiven Ausschlag des Algorithmus geführt haben, aber keine membranständige BEST1-L224-Lokalisation bewirkten.

(D) Es sind Beispiele aus 37 Wirkstoffen gezeigt, die eine membranständige BEST1-L224M-Lokalisation bewirkten.

Zusammenfassend wurden 2.645 bioaktive Wirkstoffe bzgl. ihrer Wirkung auf die BEST1-L224M-Lokalisation hin untersucht. Dabei waren 72 Wirkstoffe positiv im primären Screening mit einem prozentualen Anteil an Zellen mit membranständiger BEST1-Lokalisation von mehr als 20 %. Davon bewiesen 37 Wirkstoffe nach individueller optischer Analyse tatsächlich eine membranständige BEST1-Lokalisation. Diese Ergebnisse zeigen, dass der etablierte Lokalisations-Assay als Pipeline für Wirkstoffscreens im Hochdurchsatz zur Identifizierung von BEST1-Korrektoren verwendet werden kann.

3.3.2 Screening einer Kollektion von 2.560 Wirkstoffen mittels Halogenidtransport-Assay-Plattform und Validierung der Wirksamkeit potentieller BEST1-Potentiatoren

In Kapitel 3.2.2 wurde die Etablierung der Halogenidtransport-Assay-Plattform zur Wirkstoffanalyse im 96-Well-Format beschrieben. Auf dieser Basis wurde nun eine kommerziell erworbene Kollektion aus 2.560 Wirkstoffen (The Spectrum Collection, Microsource Discovery Systems) auf einen BEST1-Potentiator hin abgesucht. Die Screening-Schritte sind in Abbildung 27 dargestellt und werden nachfolgend erläutert.

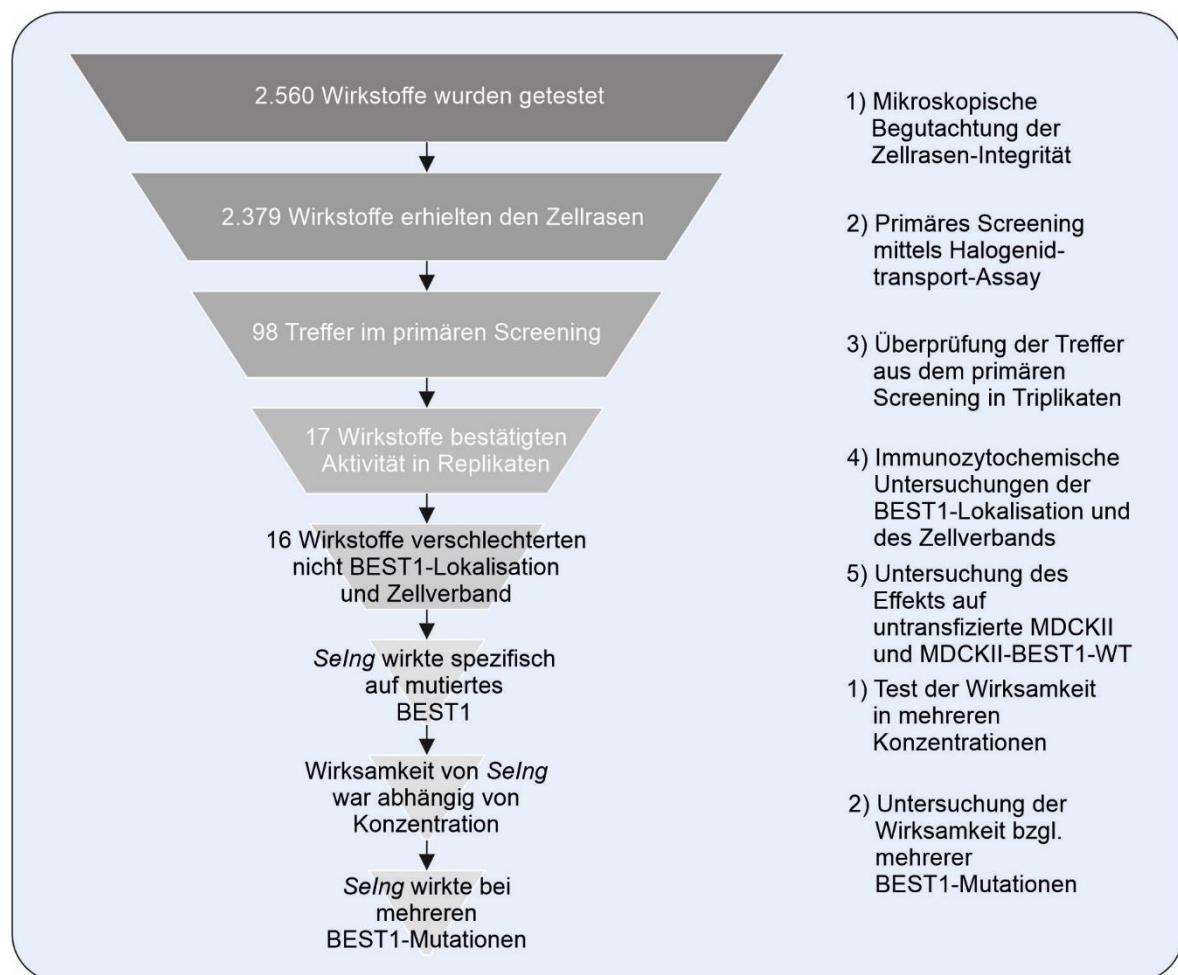


Abbildung 27.: Übersicht über die Schritte des Wirkstoff-Screenings auf der Suche nach einem BEST1-Potentiator.

MDCKII-BEST1-R218C wurden auf 96-Well-Platten kultiviert und auf jede der 96 Vertiefungen wurde je ein Wirkstoff aus der Wirkstoffkollektion in einer Konzentration von 10 µM gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Vertiefungen zunächst mithilfe des Mikroskops auf die Integrität des Zellrasens hin

begutachtet. 181 Wirkstoffe, die sich toxisch auf die Zellen ausgewirkt hatten und zum Ablösen des Zellrasens von der Platte geführt hatten, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Anschließend wurden im Rahmen des Halogenidtransport-Assays die Iodid-induzierten Änderungen der YFP-Fluoreszenzintensität am Plattenlesegerät aufgezeichnet und anhand von Graphiken ausgewertet (Abbildung 28). 98 Wirkstoffe bewirkten eine sichtbare Erniedrigung der YFP-Fluoreszenzintensität bei MDCKII-BEST1-R218C und wurden somit als positive Treffer im primären Screening eingestuft.

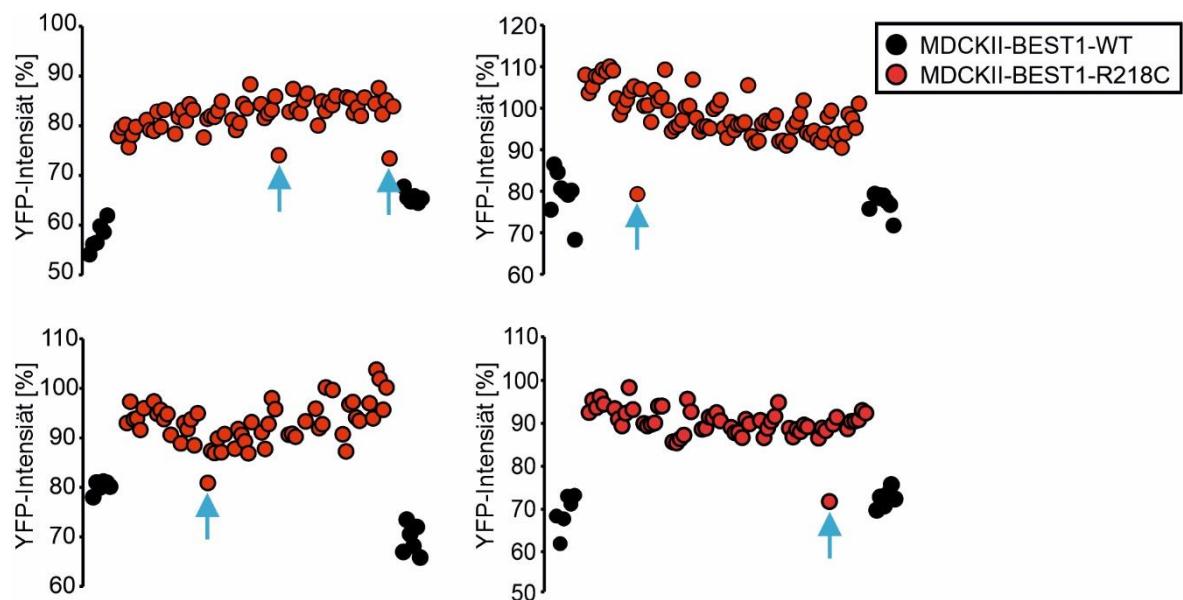


Abbildung 28: Primäres Screening mittels Halogenidtransport-Assay-Plattform.

Es sind 4 Beispiele für Graphiken zur Analyse des Halogenidtransport-Assays abgebildet. MDCKII-BEST1-R218C wurden auf 96-Well-Platten kultiviert und 24 h mit 10 µM Wirkstoff aus der Spektrum-Kollektion behandelt. Am Plattenlesegerät wurden die Iodid-induzierten Änderungen der YFP-Fluoreszenzintensitäten gemessen. Jeder Kreis repräsentiert ein Well der 96-Well-Platte und damit einen Wirkstoff. Blaue Pfeile markieren Vertiefungen mit erniedrigter YFP-Intensität 60 sec nach Iodid-Applikation und stellen deuten somit auf positive Treffer hin.

Diese 98 Treffer wurden in Triplikaten bei einer Konzentration von 10 µM und 50 µM erneut im Halogenidtransport-Assay auf ihren Effekt auf die BEST1-Kanalfunktion hin getestet. Dabei bestätigte sich die Wirksamkeit von 17 Wirkstoffen (Abbildung 29).

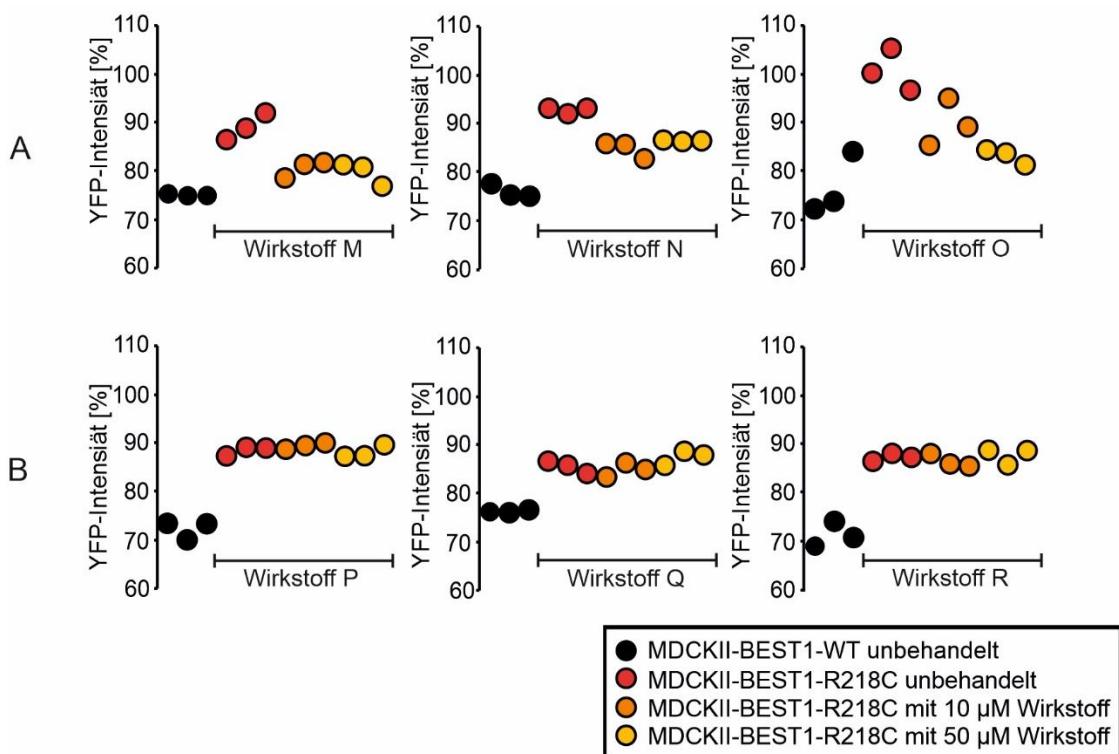


Abbildung 29: Triplikate der positiven Treffer des primären Screenings bzgl. eines BEST1-Potentiators.

Es sind beispielhafte Analysen abgebildet. MDCKII-BEST1-R218C wurden auf 96-Well-Platten kultiviert und 24 h mit 10 µM Wirkstoffen der Spektrum-Kollektion behandelt. Jeder Kreis steht für eine der 96 Vertiefungen.

(A) Wirkstoffe, die ihre primäre Aktivität in Replikaten bestätigten.

(B) Wirkstoffe, die ihre primäre Aktivität in Replikaten nicht bestätigten.

Der Effekt dieser 17 Treffer auf die BEST1-Lokalisation und den Zellverband wurde immunozytochemisch untersucht. Keiner der 17 Wirkstoffe bewirkte eine Korrektur der Proteinlokalisierung von BEST1-L224M oder BEST1-Y227N. Jedoch führte ein Wirkstoff zur Beschädigung des Zellverbands und zur verstärkten Fehllokalisation von mutiertem BEST1 (Abbildung 30).

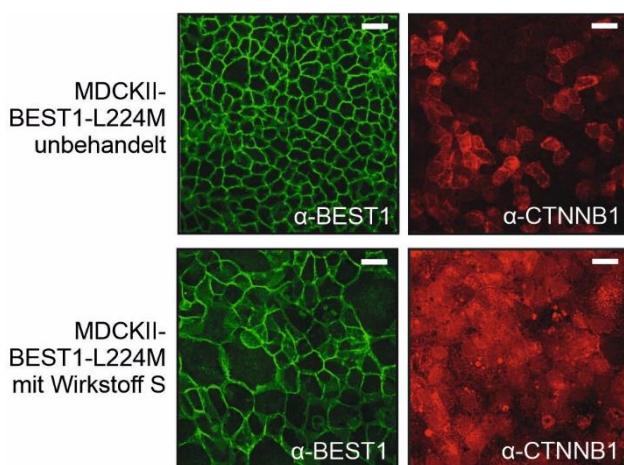


Abbildung 30: Wirkstoffeffekt auf BEST1-Lokalisation und Zellverband.

MDCKII-BEST1-L224M wurden 24 h mit 10 µM Wirkstoffen der Spektrum-Kollektion behandelt, fixiert und immunozytochemisch gefärbt (rot = α-BEST1(C2/C3) - Antikörperfärbung, grün = α-CTNNB1). Maßstabsleisten: 20 µm.

Die restlichen 16 Treffer wurden im Halogenidtransport-Assay auf ihren Effekt bzgl. untransfizierter MDCKII und MDCKII-BEST1-WT hin untersucht. 15 Wirkstoffe beeinflussten deren YFP-Fluoreszenzintensitäten und wirkten somit nicht spezifisch auf mutiertes BEST1 (Abbildung 31). Auf MDCKII-BEST1-WT und MDCKII, die kein *BEST1* exprimieren, hatte nur ein Wirkstoff keinen bzw. einen vergleichsweise geringen Effekt. Dieser Wirkstoff wird nachfolgend mit dem Codenamen „The Secret Ingredient“ (*Selng*) bezeichnet.

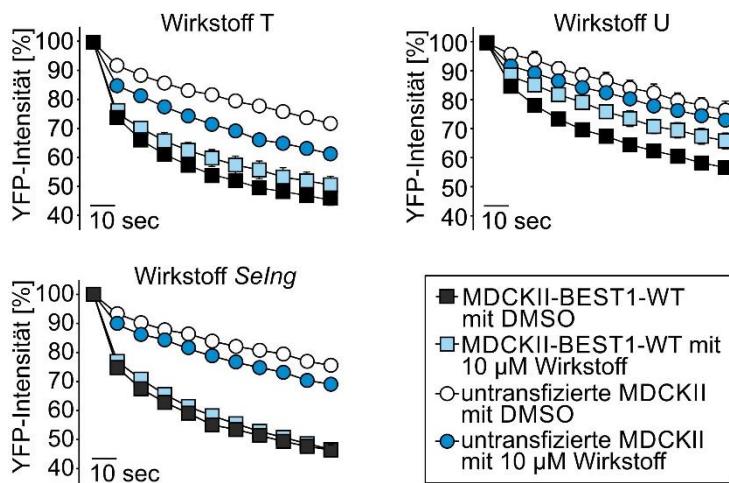


Abbildung 31: Wirkstoffeffekte auf untransfizierte MDCKII und MDCKII-BEST1-WT.

Es sind beispielhafte Analysen abgebildet. Untransfizierte MDCKII und MDCKII-BEST1-WT wurden 24 h mit 10 µM der angezeigten Wirkstoffe behandelt und die Iodid-induzierte Änderung der YFP-Fluoreszenzintensität am Plattenlesegerät aufgezeichnet. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n = 10).

Des Weiteren wurde der Effekt von *Selng* im Halogenidtransport-Assay in 8 Konzentrationen (0,125 bis 20) getestet. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Wirkung (Abbildung 32).

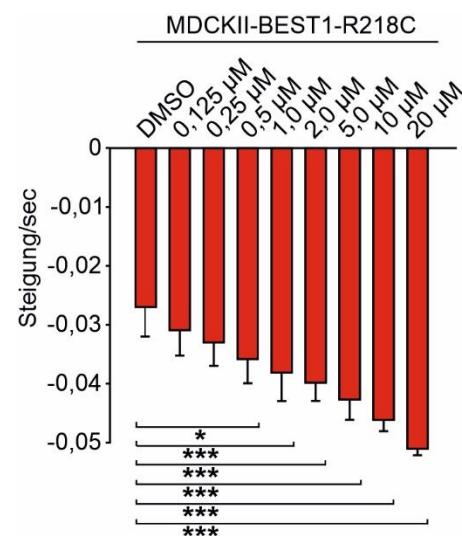


Abbildung 32: Wirksamkeit von *Selng* auf mutiertes BEST1 in mehreren Konzentrationen.

MDCKII-BEST1-R218C wurden 24 h mit *Selng* in der angezeigten Konzentration behandelt. Anschließend wurde die Iodid-induzierte Änderung der YFP-Fluoreszenzintensitäten am Plattenlesegerät gemessen. Dargestellt ist die Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n = 10). Sternchen markieren statistische Signifikanz (*p < 0,05) oder sehr starke statistische Signifikanz (**p < 0,01) unter Verwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student-T-Tests.

Außerdem wurde die Wirksamkeit von *Selng* für mehrere BEST1-Mutationen (BEST1-R218C, BEST1-Y227N und BEST1-L21V) nachgewiesen (Abbildung 33).

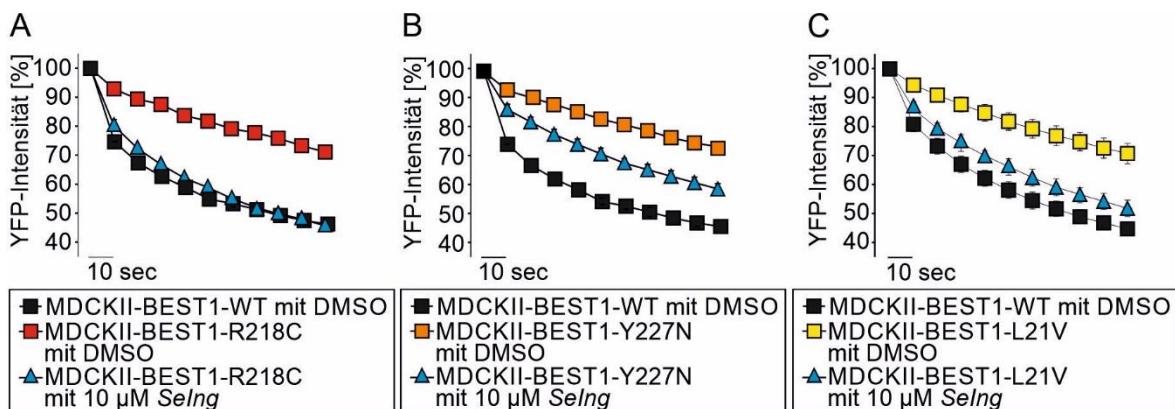


Abbildung 33: Wirksamkeit von *Selng* auf den BEST1-Anionentransport in mehreren pathogenen BEST1-Varianten.

Angezeigte, polarisierte MDCKII-Zelllinien wurden mit 10 µM *Selng* behandelt. Anschließend wurde die Iodid-induzierte Änderung der YFP-Fluoreszenzintensitäten am Plattenlesegerät gemessen. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n = 10).

Zusammenfassend wurden 2.560 Wirkstoffe mittels Halogenidtransport-Assay bezüglich ihrer Effekte auf die BEST1-Kanalfunktion getestet. Durch die Ausführung mehrerer Screening-Schritte gelang es, *Selng* als Top-Wirkstoffkandidaten für einen Wirkstoff zu identifizieren, der die BEST1-Kanalfunktion nachhaltig verbessern konnte. *Selng* wirkt dabei spezifisch und konzentrationsabhängig auf mehrere pathogene BEST1-Varianten. Gleichzeitig wurde somit die Eignung der Halogenidtransport-Assay-Plattform bestätigt, im Wirkstoffscreening einen BEST1-Potentiator detektieren zu können.

3.4 Validierung der biologischen Aktivität des Wirkstoffkandidaten *Selng* in hiRPE

Selng wurde im vorausgegangenen Kapitel als Top Kandidat zur Verbesserung der BEST1-Kanalfunktion identifiziert. Dies wurde mittels eines fluoreszenzbasierten Halogenidtransport-Assays ermittelt. Um diesen Befund zu validieren, sollten nun die BEST1-Anionenströme direkt im *Patch-Clamp* Verfahren gemessen werden. Versuche, die zur Etablierung der BEST1-Kanalaktivität, sowie zur allgemeinen Etablierung der *Patch-Clamp*-Methode am Institut geführt haben, sind im Supplement abgebildet.

Es wurden *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration durchgeführt und die Kalzium-aktivierten Anionenströme in behandelten und unbehandelten hiRPE-Zellen mit der Kontrolle verglichen. Wie in Abbildung 34 dargestellt, zeigen

hiRPE-BEST1+/+ Anionenströme, die in hiRPE-BEST1-R218C/+ signifikant verringert sind. Die Zugabe von 10 µM *Selng* führte zu einem signifikanten Anstieg der Anionenströme in hiRPE-BEST1-R218C/+.

Dies bestätigte die Wirksamkeit von *Selng* als *Potentiator* durch die Wiederherstellung der BEST1-Kanalfunktion.

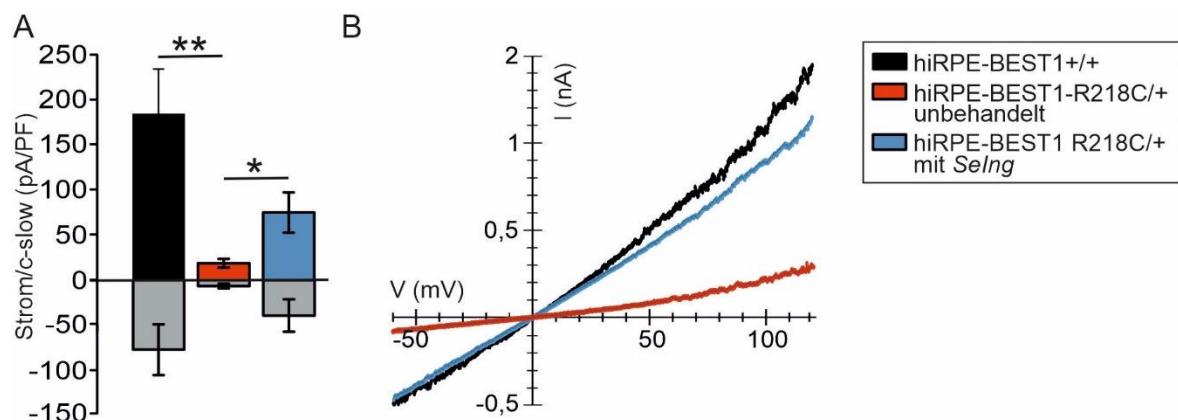


Abbildung 34: Einfluss von *Selng* auf die BEST1-Chloridleitfähigkeit in hiRPE.

Zellen wurden mit TrypLE aus dem Zellrasen gelöst, vereinzelt und auf Deckgläsern ausgesät, um *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration durchzuführen.

(A) Darstellung der maximale Anionenströme bei +120 mV und -60 mV. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben ($n = 8-10$). Sternchen markieren statistische Signifikanz (* $p < 0.05$) oder starke statistische Signifikanz (** $p < 0.01$) unter Verwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student-T-Tests.

(B) Repräsentative Darstellung der Strom-Spannungs-Amplituden.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Hochdurchsatz-geeignete Screening-Plattformen zu entwickeln, um Modulatoren für eine reguläre *BEST1*-Funktion aufzudecken. Entsprechend wurden zwei *BEST1*-exprimierende Zellkultursysteme entwickelt, einschließlich Patienten-abgeleiteter hiRPE-Linien, die endogen *BEST1* exprimieren und ein zweites Zellsystem auf der Basis von MDCKII-Zellen mit transgener *BEST1*-Expression.

Auf der Suche nach einem stabilen zellulären Phänotyp mit Relevanz für die M. Best-Symptomatik wurden die *BEST1*-exprimierenden Zellmodelle bzgl. dem *BEST1*-Protein zugeschriebener Eigenschaften bzw. Funktionen, wie beispielsweise POS-Degradation, Phagozytoseaktivität oder Zellvolumenregulation untersucht. Mutationsabhängige spezifische Effekte auf den lysosomalen pH-Wert von hiRPE-Zellen nach Biopartikel-Phagozytose waren geeignet für weitere Anwendungen, eigneten sich jedoch aufgrund hoher Kosten der Assay-Komponenten nicht für den Hochdurchsatz. Reproduzierbare und quantifizierbare Phänotypen wurden bei der *BEST1*-Lokalisation und *BEST1*-Kanalfunktion detektiert.

Normales *BEST1* zeigte in den generierten Zelllinien eine authentische *BEST1*-Lokalisation an der Plasmamembran, während mehrere pathogene *BEST1*-Varianten (*BEST1*-T6P, *BEST1*-L21V, *BEST1*-W93C, *BEST1*-L224M, *BEST1*-Y227N, *BEST1*-Q238R, *BEST1*-A243V, *BEST1*-F305S) stark fehl lokalisiert waren. Um Korrektoren für eine verbesserte *BEST1*-Lokalisation zu identifizieren, wurde ein immunozytochemischer Lokalisierungs-Assay entwickelt und in Verbindung mit Roboter-basierter Prozessautomatisierung in ein 384-Well-Plattenformat konvertiert.

Unter Verwendung dieser Lokalisations-Assay-Plattform wurde eine Bibliothek von 2.645 bioaktiven Verbindungen auf einen Effekt auf die *BEST1*-Fehllokalisierung hin untersucht. Ein Algorithmus identifizierte 72 positive Treffer im primären Screening und nach individueller visueller Beurteilung wurden 37 Substanzen als potentielle Korrektoren der *BEST1*-Lokalisation bestätigt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BEST1-Kanalfunktion als ein sehr geeigneter Parameter zur Unterscheidung von normalem und mutantem Protein herangezogen werden kann. Mutiertes BEST1 zeigt reproduzierbar eine signifikant verringerte Anionenpermeabilität. Zur Entwicklung eines HTS-geeigneten Halogenidtransport-Assays wurde der Biosensor YPF transgen in MDCKII-Zellen exprimiert und der Assay im 96-Well-Format etabliert. Dieser Assay wurde für das Screening einer Bibliothek von 2.560 Verbindungen verwendet. Damit sollten Substanzen identifiziert werden, welche die Kanalfunktion des mutierten BEST1 wiederherstellen können und somit als *Potentiatoren* agieren. 98 Verbindungen zeigten in einem initialen Screening Wirksamkeit und wurden weiter analysiert. In mehreren Screening-Schritten erweist sich der Wirkstoff *Selng* durch seine spezifische und konzentrationsabhängige Funktionalität auf mehrere BEST1-Mutationen als vielversprechender Wirkstoffkandidat. Mittels eigens im Rahmen dieser Arbeit etabliertem *Patch-Clamp*-System wurde dieser Kandidat auch für das hiRPE-Zellsystem verifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die beiden neu etablierten HTS-Pipelines eignen, potentielle BEST1-*Korrektoren* zur Verbesserung der BEST1-Lokalisation sowie BEST1-*Potentiatoren* zur Wiederherstellung der BEST1-Kanalfunktion in M. Best zu detektieren.

4.1 Charakterisierung der BEST1-Zellsysteme

Beide Zellkulturmodelle wurden strukturell und funktionell im Detail charakterisiert. Dies offenbarte einen stabilen, replizierbaren und M. Best-spezifischen Phänotyp, auf dessen Basis ein HTS-geeigneter Screening-Assay entwickelt werden konnte.

4.1.1 Pathogene BEST1-Varianten fehllokalisieren

Wie zahlreiche Studien an transgenen und nativen Zellsystemen aus verschiedenen Labors belegen, ist wildtypisches BEST1 an der basolateralen Plasmamembran lokalisiert, wohingegen eine große Anzahl an M. Best-assoziierten BEST1-Mutationen in bisher uncharakterisierten Zellkompartimenten des Zytosplasmas verortet ist (Mullins et al., 2007; Davidson et al., 2011; Johnson et al. 2014; Milenkovic et al., 2015; Nachtigal et al., 2020). Ergebnisse dieser Arbeit

bestätigen dies: Sechs der sieben untersuchten pathogenen BEST1-Varianten fehllokalierten im MDCKII-Zellsystem (BEST1-T6P, BEST1-L21V, BEST1-W93C, BEST1-L224M, BEST1-Y227N und BEST1-F305S). In hiRPE fehllokalierten BEST1-A234V und BEST1-Q238R, während BEST1-N11K, BEST1-R218C und BEST1-I295del wie nicht-mutiertes BEST1 an der Plasmamembran verortet waren.

Ursache für die Fehllokalisierung der BEST1-Mutationen könnte ein Defekt im Proteintransport vom Syntheseort im endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran sein, wie er auch in anderen Ionenkanalerkrankungen vorliegt (Jentsch et al., 2005; Pedemonte und Galietta, 2012). Studien unseres Instituts haben bereits gezeigt, dass der Proteintransport des M. Best-assoziierten BEST1 zur Zellmembran von einer erhöhten Proteindegradation begleitet wird (Milenkovic et al., 2017; Nachtigal et al., 2020). Abhängig von der Art der Mutation kann sich die Primärstruktur oder Proteinfaltung im Verlauf der Proteinsynthese so verändern, dass das mutierte Protein von den Qualitätskontrollmechanismen der Zelle erkannt und vorzeitig dem Abbau zugeführt wird. Folglich gibt es für ein intrinsisches Membranprotein wie BEST1 keinen Transport von der Synthesestelle, dem endoplasmatischen Retikulum, zu seinem Zielort in der Membran. Das mutierte Protein ist daher in der Zelle unregelmäßig, hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten des Zytosplasmas lokalisiert (rezensiert von Milenkovic et al., 2020).

Eine Limitierung dieser Arbeit besteht in dem größtenteils fehlenden Vergleich zwischen MDCKII und hiRPE bzgl. Lokalisation der einzelnen BEST1-Mutationen. Nur die Mutation BEST1-R218C lag bei dieser Arbeit sowohl im MDCKII- als auch im hiRPE-Zellmodell vor. Umso wichtiger ist es, die vorliegenden Ergebnisse aus dem transgenen MDCKII-Zellmodell mit denen aus nativen Zellsystemen andere Arbeitsgruppen zu vergleichen. Die membranständige Lokalisation von BEST1-R218C wurde bereits in RPE von Ratten beschrieben (Marmorstein et al., 2004). Die Fehllokalisierung von BEST1-Y227N wurde selbst postmortal im humanen Auge festgestellt (Mullins et al., 2005). Eine Diskrepanz ergibt sich allerdings in Beobachtungen der Variante BEST1-W93C, die in dieser Arbeit als auch bei Arbeiteten der Arbeitsgruppe Johnson et al. (2013) in MDCK-Zellen fehllokaliert, jedoch in fhRPE (Johnson et al., 2013; Marmorstein et al., 2015) sowie im RPE der

Ratte (Marmorstein et al., 2004) korrekt lokalisiert. Dies zeigt einmal mehr, dass eine Fehllokalisierung aufgrund von transgener Überexpression in heterologen Systemen ein Problem darstellt, das bekanntermaßen die Studien zum Proteintransport beeinflusst (Kintaka et al., 2016). Grund dafür ist, dass zelluläre Ressourcen der posttranslationalen Modifikation und des Proteintransports begrenzt sind. Die übermäßige Überexpression eines transgenen Proteins kann zu einer Überladung der Zelle und Erschöpfung der Ressourcen führen. So können Membranproteine nicht mehr an die Membran transportiert werden. Die Fehllokalisierung in MDCKII-Zellen mancher BEST1-Mutationen, die hingegen im naiven Zellsystemen korrekt lokalisieren, könnte demnach die überlastete Kapazität des Proteintransport-Systems im transgenen Zellmodell reflektieren. Die heterologe Expression von Proteinen in MDCKII-Zellen stellt zwar ein exzellentes Zellkulturmodell dar, dennoch sollten Proteintransport-Studien durch ein natives Zellsystem validiert werden.

Generell stören einige BEST1-Mutationen (BEST1-T6P, BEST1-L21V, BEST1-W93C, BEST1-L224M, BES1-Y227N, BEST1-Q238R, BEST1-A243V, BEST1-F305S) den Proteintransport an die Plasmamembran in hiRPE als auch MDCKII. Aufgrund des stabilen Phänotyps über mehrere unabhängige Zelllinien hinweg eignet sich der Lokalisations-Assay hervorragend zur Etablierung einer Screening-Pipeline im Hochdurchsatz-Format.

4.1.2 Pathogene BEST1-Varianten zeigen verringerte Kanalfunktion

Dass BEST1 als Anionenkanal fungiert und M. Best-assoziierte Mutationen verringerte Kanalfunktion zeigen, wurde bereits früher in transgenen HEK293T-Zellen (rezensiert von Hartzell et al., 2008; Vaisey et al., 2016; Miller et al., 2019) und hiRPE-Linien beschrieben (Moshfegh et al., 2016; Li et al., 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies im MDCKII-Zellmodell mittels indirekter Biosensor-basierter Messung des Halogenidtransports, als auch durch direkte Messung des Anionenstroms von hiRPE mittels eigens etabliertem *Patch-Clamp*-System.

Alle getesteten M. Best-assoziierten Zelllinien zeigten einheitlich eine reduzierte Kanalfunktion. Auch BEST1-Mutationen die eine membranständige BEST1-

Lokalisation aufwiesen, zeigten reduzierten BEST1-Halogenidtransport. Dies legt nahe, dass in den Mutationen mit korrekter BEST1-Lokalisation die verringerte Kanalfunktion nicht auf eine Störung des Proteintransports zurückgeht, sondern vielmehr eine Änderung der BEST1-Stuktur mit Einfluss auf die Durchlässigkeit der Pore hervorruft. Dass einige BEST1-Mutationen strukturelle Veränderungen mit Auswirkungen auf die Poredurchlässigkeit in BEST1 verursachen, wurde bereits beschrieben (Miller et al., 2019).

Zusammenfassend präsentierte sich der M. Best-Phänotyp bzgl. der BEST1-Kanalfunktion stabil replizierbar, sodass seine Detektion mittels Halogenidtransport-Assay als HTS-geeignet erschien.

4.1.3 M. Best-assoziierte hiRPE-Zellen zeigten erhöhten lysosomalen pH-Wert infolge von Biopartikel-Phagozytose

Eine frühe klinische Manifestation von M. Best ist das Auftreten subretinaler gelblicher Läsionen in der Makula (Mohler und Fine et al. 1981; rezensiert von Boon et al., 2009; Xiao et al. 2009). Diese Läsionen setzten sich vorwiegend aus Lipofuszin zusammen, ein altersassoziiertes Pigment, das aus autofluoreszierenden Abbauprodukten phagozytierter POS besteht (Bakall et al., 2007; rezensiert von Boon et al., 2009). Diese Akkumulation der POS-Abbauprodukte in der Makula könnte auf eine unzureichende POS-Degradation im RPE der M. Best-Patienten zurückzuführen sein (Fischmeister und Hartzell, 2005; rezensiert von Xiao et al., 2010).

Auf der Suche nach einem robusten zellulären M. Best-spezifischen Phänotyp wurde im Rahmen dieser Arbeit die POS-Degradation in hiRPE untersucht. Es konnte jedoch kein Einfluss von BEST1-Mutationen auf den POS-Abbau in hiRPE festgestellt werden. Das steht im Widerspruch zu den Studien von Sing et al. 2013 und 2015. Dort wird eine verringerte Rate des POS-Abbaus in M. Best-assoziierten hiRPE beschrieben. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte in voneinander abweichenden Pathomechanismen der untersuchten BEST1-Mutationen in den beiden Arbeiten liegen. Während in der vorliegenden Arbeit hiRPE Zelllinien von Patienten mit der Mutation BEST1-Q238R untersucht wurden, wurden bei Singh et al. 2013 und 2015 die Mutationen BEST1-A146K und BEST1-

N296H analysiert. Unterschiede in den POS-Degradationsraten könnten auf Mutations-spezifische Effekte zurückgehen. Dass die Pathomechanismen der untersuchten Mutationen voneinander abweichen ist sogar wahrscheinlich, da auch Unterschiede in der BEST1-Lokalisation der Mutationen vorliegen. Während BEST1-A146K und BEST1-N296H membranständig sind, (Singh et al., 2013) ist BEST1-Q238R fehllokaliert. Grundsätzlich wird eine hohe Varianz zwischen Patienten mit unterschiedlicher oder sogar gleicher BEST1-Mutation bezüglich Expression und Alter der Krankheitspräsentation beobachtet (rezensiert von Boon et al., 2009; Marmorstein et al., 2009). Etwa 7-9 % der Patienten mit BEST1-Mutationen weisen lange Zeit ein normales Sehvermögen auf oder erfahren bis ins hohe Alter keinerlei visuelle Einschränkungen (Nordstrom und Thorburn, 1980). Um aufzuklären, ob die POS-Degradation tatsächlich zwischen den M. Best-assoziierten Mutationen variiert, sollten entsprechend umfassende Versuche mit allen weiteren uns verfügbaren BEST1-Mutationen (BEST1-N11K, BEST1-R218C, BEST1-A243V, BEST1-I295del) unternommen werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt, da sich POS-Degradations-Experimente durch die aufwendige und zeitintensive POS-Gewinnung als uninteressant für einen angestrebten HTS-Ansatz herausstellten.

Des Weiteren wurde auch die Phagozytose-Tätigkeit der hiRPE-Zellen untersucht. Dazu wurde die Aufnahme kommerziell erworbener, gebrauchsfertiger Biopartikel in Kontroll- und M. Best-assoziierten hiRPE beobachtet. Die Phagozytoseaktivität der Biopartikel in die hiRPE war gut zu beobachten, doch war kein Effekt der BEST1-Mutationen auf die Phagozytoserate zu erkennen. Interessanterweise waren aber die lysosomalen pH-Werte nach der Aufnahme von Biopartikeln in M. Best-assoziierte hiRPE im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien signifikant erniedrigt. Dies lässt eine Alkalisierung der Lysosomen der M. Best-hiRPE vermuten. Singh et al. 2015 untersuchten bereits den lysosomalen pH-Wert unbehandelter hiRPE und erkannten keinen M. Best-spezifischen Effekt. Doch wurden im Rahmen deren Studie die hiRPE nicht durch die Zugabe von POS oder Biopartikeln vorbehandelt. Es ist also durchaus möglich, dass sich der mutationsspezifische Effekt auf den pH-Wert erst durch die Indizierung lysosomalen Stresses durch Biopartikel-Phagozytose in hiRPE einstellt.

Grundsätzlich weisen die Befunde dieser Arbeit darauf hin, dass in den M. Best-assoziierten hiRPE eher eine lysosomale Alkalisierung vorliegt, als ein Defekt der POS-Degradation oder der Phagozytoseaktivität. Phagozytoseversuche waren aufgrund der hohen Kosten der Biopartikel und der Varianz unter den Messwerten nicht für die Anwendung im Hochdurchsatz geeignet. Der hier beobachtete Effekt von mutiertem BEST1 auf den lysosomalen pH-Wert wurde am Institut weiterverfolgt und in weiterführenden Untersuchungen bestätigt (Nachtigal et al., 2020).

4.1.4 Tendenz zum erhöhten Zellvolumen in M. Best-hiRPE

Eine Studie unseres Labors hat gezeigt, dass BEST1 als wesentlicher Bestandteil eines Volumen-regulierten Anionenkanals fungiert (Milenkovic et al., 2015). Dazu wurden Anionenströme nach Stimulation mit hypoosmotischer Lösung in hiRPE gemessen. Die Anionenströme von M. Best-assoziierten hiRPE waren stark reduziert (Milenkovic et al., 2015), was im Einklang mit umfassenden Forschungsergebnissen an Best1 in *Drosophila* steht. Demnach wird Best1 in *Drosophila* abhängig von Zellschwellung aktiviert und fungiert als Anionenkanal (Fischmeister und Hartzell, 2005; Chien und Hartzell, 2007 und 2008; Stotz und Clapham, 2012; Duran et al., 2013). Auch eine Studie in fetalen humanen RPE (fhRPE) stützt diese Hypothese und beschreibt, dass transgen exprimiertes *BEST1* nach ATP-Stimulation das Schrumpfen von fhRPE-Zellen verursacht (Marmorstein et al., 2015). Konkret zeigt die vorrangegangene Studie unseres Labors Anionenströme in hiRPE, die durch Zellschwellung induziert wurden (Milenkovic et al., 2015). In *Xenopus laevis* (*X. laevis*) -Oozyten zeigte transgen exprimiertes *BEST1* einen protektiven Effekt bei hypoosmotischer Zellruptur (Milenkovic et al., 2015). Auf Grundlage dieses aktuellen Kenntnisstandes hat sich die Hypothese gebildet, dass *BEST1* maßgeblich an der geregelten Volumenverringerung der RPE-Zelle beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal nicht nur die Anionenströme (Milenkovic et al., 2015), sondern auch konkret die Volumina von hiRPE-Zellen infolge von hypoosmotischen Stress gemessen. Während ein M. Best-spezifischer Effekt auf die akute Volumenregulierung zwar nicht beobachtet werden konnte,

zeigte sich in dieser Arbeit dennoch eine Tendenz dahingehend, dass M. Best-assoziierte hiRPE im Ausgangswert und damit in nicht akut gestresstem Zustand ein größeres Volumen als Kontroll-hiRPE aufweisen. BEST1 könnte folglich zwar an der Volumenregulation der Zelle beteiligt sein, jedoch weniger im Rahmen der akuten Volumenregulation, sondern eher in der Langzeitanpassung. Auch hier könnten Mutations-spezifische Effekte greifen. Für die Studie von Milenkovic et al. 2015 an *X. laevis*-Oozyten wurden BEST1-R218C und BEST1-L227M untersucht, während die Volumenregulations-Messungen dieser Arbeit an BEST1-Q238R erfolgten.

Letztlich ist auch die hiRPE-Volumenmessung aufgrund der Instabilität des M. Best-spezifischen Effekts zumindest für die untersuchte Zelllinie nicht vorrangig für ein Wirkstoffscreening im Hochdurchsatz geeignet.

4.2 Lokalisations-Assay dient als effiziente Screening-Plattform

In den letzten zehn Jahren ermöglichten Fortschritte beim *High-Content-Screening* (HCS) die quantitative Messung eines breiten Spektrums phänotypischer Veränderungen auf zellulärer Ebene (rezensiert von Boutros et al., 2015). HCS ist eine leistungsstarke Methode auf Basis automatisierter Mikroskopie und Bildanalyse und wird vor allem angewandt, um Veränderungen von subzellulären Proteinpositionen zu beurteilen. Auf der Suche nach therapeutisch wirksamen Stoffen wurden durch das HCS in einigen Bereichen große Fortschritte erzielt. Besonders umfangreich wird HCS in der Onkologie zur Identifizierung molekularer Signalkaskaden sowie zur Arzneimittelentdeckung und -Entwicklung genutzt (rezensiert von Eder et al., 2014). Des Weiteren wird HCS in der klinischen Forschung an Infektionskrankheiten (Zych et al., 2013), neurodegenerativen Erkrankungen (Kaufmann et al., 2015; Rhim et al., 2015; Whitton et al., 2015), entzündlichen Erkrankungen (Wittmann et al., 2012), Stoffwechselerkrankungen (Donato et al., 2012) und der myotonen Dystrophie (Nierobisz et al. 2013) angewandt. Das bildbasierte HCS mit seiner kombinierten Fähigkeit, multiparametrische Daten zu liefern, eine subzelluläre Auflösung bereitzustellen und eine Analyse der Zellpopulation zu ermöglichen, ist für die Identifizierung möglicher therapeutischer Wirkstoffkandidaten besonders wertvoll.

Unter Verwendung eines HCS-Systems konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit und in intensiver Zusammenarbeit mit der „Hochdurchsatz-Drug- und -Target-Discovery“-Gruppe (Dr. Kamran Honarnejad) der Fraunhofer Gesellschaft ITEM Regensburg erfolgreich eine skalierbare Screening-Plattform entwickelt werden. Von 2.645 bioaktiven Wirkstoffen, die auf ihren Einfluss auf die BEST1-L224M-Lokalisation hin untersucht wurden, zeigten 72 primäre Aktivitäten. Davon erwiesen sich aufgrund weiterer optischer Einschätzungen 37 Wirkstoffe tatsächlich mit einer positiven Wirkung auf die Membranständigkeit der BEST1-Lokalisation. 47,14 % der Wirkstoffe mit primärer Aktivität zeigten zwar eine veränderte, aber keine membranständige Lokalisation. Hier könnten Verfeinerungen im Analyse-Algorithmus helfen, um spezifischer Wirkstoffe als positive Treffer zu detektieren, die tatsächlich die BEST1-Lokalisation korrigieren. Allerdings ist schon allein die Detektion von Wirkstoffen, die generell die BEST1-Lokalisation beeinflussen, durchaus wertvoll. Diese können schließlich Hinweise auf BEST1-Signalwege und -Kaskaden geben, die mit der korrekten Expression und Lokalisation von BEST1 assoziiert zu sein scheinen.

Grundsätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass der hier etablierte Lokalisations-Assay das Potential besitzt, im roboterautomatisierten HTS potentielle BEST1-Korrektoren zu detektieren.

4.3 Halogenidtransport-Assay dient als effiziente Screening-Plattform

Auf der Suche nach BEST1-Potentiationen, welche die Kanalfunktion pathogener BEST1-Varianten wiederherstellen sollen, war die Entwicklung eines geeigneten funktionellen Assays erforderlich. Die *Patch-Clamp*-Technik gilt als Goldstandard bei der Untersuchung von Ionenkanalfunktionen, da es die direkte Aufzeichnung von Änderungen der Ionenkanalaktivität ermöglicht. Diese elektrophysiologische Methode ist jedoch weitestgehend nicht HTS-kompatibel. Während *Patch-Clamp*-Messungen bei der Sekundäranalyse von mutmaßlichen Kanal-Modulatoren unabdingbar sind, sind sie aufgrund des großen Aufwandes und des niedrigen Durchsatzes für ein Primärscreening nur in Form von roboterautomatisierten HTS-Systemen anwendbar.

Fluoreszenz-basierte Verfahren wie der Halogenidtransport-Assay sind hingegen einfach im Aufbau und somit gut bei der Hochdurchsatz-Identifizierung von Chloridkanal-Modulatoren einsetzbar. Iodid-empfindliche Fluoreszenzindikatoren wie YFP-H148Q/I152L, die im Mutations-Screening entdeckt wurden (Galietta et al., 2001), können in Zellen transgen exprimiert werden, um eine direkte Ablesung der Halogenidkonzentration im Zytoplasma zu ermöglichen (Jayaraman et al., 2000). Beispiele für die erfolgreiche Anwendung von Halogenidtransport-Screening-Assays zur Identifizierung von Chloridkanal-Modulatoren sind die Detektion von CFTR-Inhibitoren (Ma et al., 2002) und Inhibitoren der humanen intestinalen Kalzium-aktivierten Chloridkanäle (La Fuente et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Halogenidtransport-Assay 2.560 Wirkstoffe getestet, wovon 98 im primären Screening als Treffer detektiert wurden. Durch mehrere Screening-Schritte erwies sich die Wirksamkeit des Kandidaten *Selng* als spezifisch, konzentrationsabhängig und effektiv für mehrere BEST1-Mutationen. Der positive Effekt auf die Chloridleitfähigkeit der BEST1-Kanalfunktion wurde durch *Patch-Clamp*-Messungen in hiRPE bestätigt.

Somit ist die etablierte Halogenidtransport-Plattform eine wertvolle Basis für die Suche nach einem BEST1-Potentiator. *Selng* ist ein erster vielversprechender Kandidat für eine therapeutische Anwendung bei M. Best.

4.4 Ausblick

Positive Treffer aus den Lokalisations-Assay-Screening müssen weiter validiert werden. So sollten als nächstes die Effekte auf die BEST1-Kanalfunktion und die Wirksamkeit bei unterschiedlichen Mutationen untersucht werden. So kann geklärt werden, ob der Wirkstoff nur spezifisch als Individualtherapie für Patienten mit einer definierten Mutation (z.B. BEST1-L224M) oder universell für Patienten mit unterschiedlichsten M. Best-assoziierten Mutationen in Frage kommt.

Die Überprüfung der Wirksamkeit vielversprechender Wirkstoffkandidaten wie *Selng* im Tiermodell ist aktuell in Ermangelung eines solchen schwierig. Die im Hundemodell natürlich auftretende Bestrophinopathie wird rezessiv vererbt (Guziewicz et al., 2007; Zangerl et al., 2010; Hoffmann et al., 2012) und besitzt somit wenig Relevanz für den autosomal dominant vererbten M. Best. Genetisch

manipulierte Best1-Mäuse zeigen keinen Augenphänotyp (Marmorstein et al., 2006; Milenkovic et al., 2015). Dies ist wenig verwunderlich, da murines *Best1* kaum in der Retina, sondern vorwiegend in Testikeln exprimiert wird (Milenkovic et al., 2015). Interessanterweise beeinträchtigt die *Best1-Y227N*-Mutation die Spermienfunktion in einem von Milenkovic et al. 2019 beschriebenen Mausmodell.

Für die Erforschung von Bestrophinopathien kämen Tiermodelle von Ratten, Scheinen und Makaken in Frage, da diese eine stabile *Best1*-Expression im RPE und *Best1*-Lokalisation an der RPE-Plasmamembran aufweisen (Marmorstein et al., 2000, Marmorstein et al., 2004). Tatsächlich zeigt ein temporäres M. Best-Modell in Ratten durch transgene Expression einer pathogenen *Best1*-Variante Störungen im EOG und eine Schädigung der retinalen Integrität (Marmorstein et al., 2004).

4.5 Fazit

Es wurden zwei HTS-Pipelines entwickelt, um *Korrektoren* und *Potentiatoren* des mutanten BEST1-Moleküls zu identifizieren.

Beide Pipelines haben spezifische Vorteile und Limitierungen. Der Lokalisations-Assay macht unter der Anwendung eines *High-Content*-Systems die direkte Visualisierung einer Zelle möglich und lässt so die Dokumentation zusätzlicher wertvoller Parameter wie Zellgröße und in einem gewissen Umfang die Vitalität der Zellen zu. Auf der anderen Seite zielt der Halogenidtransport-Assay direkt auf die BEST1-Funktion ab. Die Untersuchung der Chloridkanalfunktion ist besonders wertvoll, da sie sich auch im abnormalen EOG der M. Best-Patienten wiederspiegelt (Bard und Cross, 1974) und somit entscheidend für die Ausprägung der Erkrankung sein dürfte.

Somit haben beide HTS-Plattformen ihre Berechtigung und stellen wertvolle Ansätze zur Identifizierung von modifizierenden Molekülen zur Korrektur von mutantem BEST1 dar. Gerade eine Kombination aus *Korrektoren* und *Potentiatoren* könnte zum entscheidenden therapeutischen Erfolg führen. *Korrektoren* würden fehllokalierte BEST1-Varianten unterstützend an die Membran bringen und *Potentiatoren* würden gleichzeitig die Kanalfunktion des mutanten BEST1 an der Plasmamembran verbessern. Eine Erfolgsgeschichte bei

der Verwendung einer solchen Kombinationstherapie bildet die der Mukoviszidose ab. Symkevi® besteht aus dem CFTR-Korrektor Tezacaftor (van Goor et al., 2011, Clancy et al., 2012) und dem CFTR-Potentiator Ivacaftor (Accurso et al., 2014) und wurde 2018 zur Therapie zugelassen. Eine Triple-Behandlung bestehend aus zwei Korrektoren und einem Potentiator (Tezacaftor, Ivacaftor und Elexacaftor) hatten in klinischen Tests ebenfalls einen deutlichen Nutzen gezeigt (Davies et al., 2018). Die kombinatorische Anwendung von Protein-Modulatoren hat die Prognose für Patienten mit Mukoviszidose dramatisch verbessert und könnte auch eine vielversprechende Perspektive für M. Best-Patienten darstellen.

Unabhängig davon, ob die hier detektierten BEST1-Modulatoren alle erforderlichen Eigenschaften für einen Arzneimittelkandidaten aufweisen oder nicht, können diese Verbindungen zukünftig als wertvolle pharmakologische Werkzeuge dienen, um weitere Eigenschaften des BEST1 zu untersuchen. So konnte auch bei der Erforschung der Mukoviszidose die Kenntnis von CFTR-Modulatoren zu einem neuen Verständnis des CFTR-Chlorid-Kanals, seiner physiologischen Rolle und seiner Fehlfunktion bei Erkrankungen führen (Cai et al., 2004). Erweiterte Kenntnisse zu BEST1-Eigenschaften und neu identifizierte Wirkstoffziele im RPE könnten auch der Erforschung anderer Retinopathien zugutekommen. Sie könnten relevant für die Erforschung der Pathomechanismen von AMD sein, eine deutlich häufiger auftretende und komplexe Erkrankung des RPE (rezensiert von Friedman et al., 2004). Beispielsweise ermöglichten in ähnlicher Weise Erkenntnisse zu den Ursachen der seltenen juvenilen Osteoporose grundlegende Erkenntnisse zum Knochenstoffwechsel im Allgemeinen (Laine et al., 2013). Das dadurch erlangte Wissen unterstützt die Erforschung der häufig auftretenden altersbedingten Osteoporose.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile Zellsysteme generiert, die M. Best-spezifische Phänotypen bzgl. BEST1-Lokalisation und BEST1-Kanalfunktion abbilden. Darauf aufbauend wurden zwei Screening-Plattformen im Hochdurchsatz-geeigneten Format etabliert und jeweils ca. 2.500 Wirkstoffe getestet. Dabei wurden erste vielversprechende BEST1-Modulatoren für die Therapie von M. Best identifiziert.

Anhang: Installation und Etablierung eines Instituts-eigenen *Patch-Clamp*-Setups

Am Institut für Humangenetik wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Patch-Clamp-Setup geordert, aufgebaut und in Betrieb genommen. Die Komponenten des Setups sind in Abbildung 4 und Tabelle 16 dargestellt bzw. beschrieben.

Zur Etablierung der *Patch-Clamp*-Messungen wurde zunächst die Präparation der zu messenden hiRPE optimiert. Dazu wurden die Zellen abhängig von der Präparation bzgl. Vitalität, Zellgröße und Ausgangs-Anionenstrom charakterisiert. Die Vitalität der hiRPE zum Zeitpunkt der Patch-Messungen wurde durch mikroskopische Begutachtung ermittelt (Abbildung 35). Zellen, die in der siebten Passage zur Polarisierung 6 Wochen lang auf Transwell-Filtern kultiviert wurden, setzten sich nach dem Vereinzelungsprozess, der für die *Patch-Clamp*-Messungen nötig ist, kaum ab und blieben in einer sphärischen Form. Waren die Zellen nur eine Woche lang auf Transwell-Filtern, zeigten sie im Vergleich eine stärkere Adhäsion und mehrere Zellen gingen in ihre Epithelzell-typische, langgestreckte Form über. Ähnliche Beobachtungen wurden für hiRPE der Passage 4 nach einwöchiger Kultur auf Transwell-Filtern gemacht (Abbildung 35A). Fibronectin-Beschichtung der Deckgläschen, auf die hiRPE ausgesät wurden, wirkte sich im Vergleich zu unbeschichteten und Matrikel®-beschichteten Deckgläschen positiv auf die Adhäsion und die Endothelzell-typische Form aus (Abbildung 35B).

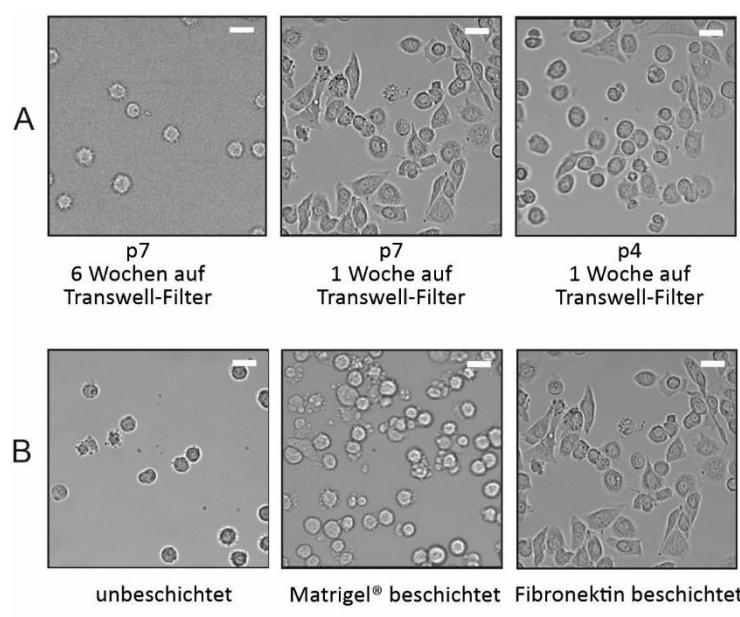


Abbildung 35: Zellpräparation der hiRPE für *Patch-Clamp*-Messungen.

Durch 8-minütige TrypLE™-Inkubation wurden hiRPE von Transwell-Filtern gelöst und auf Deckgläschen ausplattiert. Mikroskopiebilder wurden 3 h nach der Zellaussaat angefertigt.

(A) Zellen wurden bei Passage 4 oder 7 für 1 bzw. 6 Wochen auf Transwell-Filtern zur Polarisierung kultiviert.

(B) Zellen wurden bei Passage 4 und nach 1 Woche Polarisation auf Transwell-Filtern auf unterschiedlich beschichtete Deckgläschen ausgesät.

Es wurden 2 Kontroll-Zelllinien und 2 M. Best-assoziierte Zelllinien bezüglich Zellgröße und Ausgangs-Anionenstroms charakterisiert. Im Rahmen der *Patch-Clamp*-Messungen konnte auch die Zellkapazität (*c-slow*) bestimmt werden, welche proportional zur Größe der Zelle ist. Die M. Best-assoziierten Zelllinien hiRPE-BEST1-R218C/+ und hiRPE-BEST1-I285del/+ waren signifikant größer als die der 2 gesunden Spender (Abbildung 36A). Der Ausgangs-Anionenstrom aller 5 untersuchten Zelllinien war ähnlich groß (Abbildung 36B).

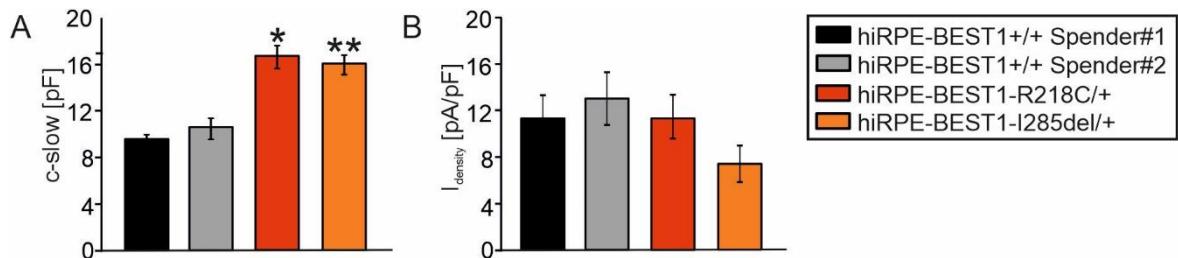
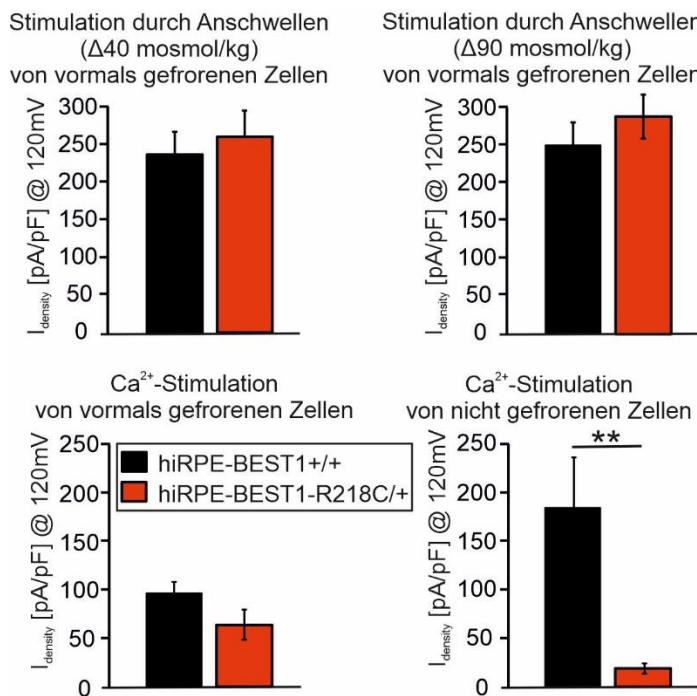


Abbildung 36: Zellkapazität und Ausgangs-Anionenstrom der hiRPE-Zelllinien.

Zellen wurden mit TrypLE aus dem Zellrasen gelöst, vereinzelt und auf Deckgläsern ausgesät. **(A)** Analyse der Zellkapazität *c-slow*. Sternchen markieren statistische Signifikanz ($p < 0.05$) oder starke statistische Signifikanz ($**p < 0.01$) unter Verwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student-T-Tests. ($n \geq 20$). **(B)** Analyse des Ausgangs-Anionenstroms. ($n \geq 20$).

Zunächst musste ein potenter Stimulator zur Öffnung der BEST1-Kanäle bei *Patch-Clamp*-Messungen gefunden werden. Dazu wurden bereits bekannte Aktivatoren getestet. Es ist beschrieben, dass BEST1 in *Patch-Clamp*-Messungen von hiRPE durch Schwellung (Milekovic et al., 2015) und durch Kalzium (Li et al., 2017) aktiviert werden kann. Schwellung-induzierte Stimulation durch hypoosmotische Lösung ($\Delta 40$ mosmol/kg) führte zwar zum Anstieg des Anionenstroms bei hiRPE-BEST1+/+, zeigte aber einen ähnlich starken Anionenstrom auch bei hiRPE-BEST1-R218C/+ (Abbildung 37). Auch der verstärkte Stimulus durch eine stärkere hypoosmotische Lösung ($\Delta 90$ mosmol/kg) stimulierte ähnliche Anionenströme in der Kontroll- und M. Best-assoziierten Zelllinie. Zellen wurden standartmäßig nach der Ausdifferenzierung von hiPSC zu hiRPE durch Passagieren expandiert und zur Lagerung in Stickstoff eingefroren. Die Stimulation mit $0,38 \mu\text{M}$ freiem Kalzium in der Patch-Pipette führte zwar zu einer Aktivierung des Anionenstroms in hiRPE. Jedoch zeigten auch hier normale und M. Best-assoziierte Zelllinien ähnlich starke Ströme. Zellen, die jedoch nach der Ausdifferenzierung nicht passagiert und nicht zwischenzeitlich eingefroren wurden, zeigten bei hiRPE-BEST1+/+ hohe Anionenströme bei $75,39 \pm 22,4059$

pA/pF und in hiRPE-BEST1-R218C/+ signifikant geringere Anionenströme von $184,63 \pm 250,6956$ pA/pF.



Die 4 beschriebenen Aktivatoren wurden auch hinsichtlich der Dauer von Start der Aktivierung bis hin zur Hälfte des Maximalwerts des erreichten Anionenstroms untersucht, um mögliche kinetische Effekte der Aktivierung zu ermitteln. In allen 4 beschriebenen Aktivatoren gab es keinen Unterschied in der Zeit zwischen normalen hiRPE und M. Best1-assoziierten hiRPE (Abbildung 38).

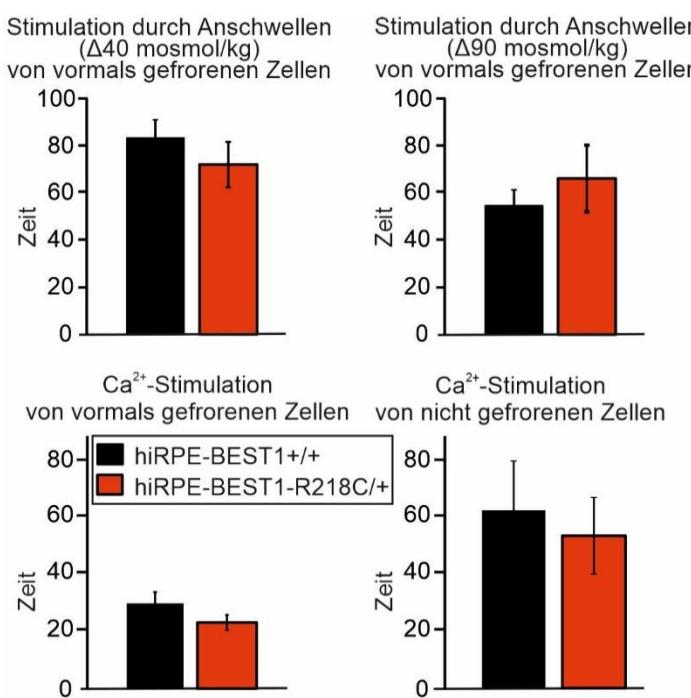


Abbildung 37: Auswirkung verschiedener Stimulatoren bzw. Zellpräparationen auf Anionenströme in hiRPE.

Zellen wurden mit TrypLE aus dem Zellrasen gelöst und vereinzelt, auf Deckgläschen ausgesät und es wurden Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen durchgeführt. Dargestellt sind die maximalen Anionenströme. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n \geq 6$). Sternchen markieren starke statistische Signifikanz (**p < 0.01) unter Verwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student-T-Tests.

Abbildung 38: Auswirkung verschiedener Stimulatoren bzw. Zellpräparationen auf die Kinetik der Anionenströme in hiRPE.

Zellen wurden mit TrypLE aus dem Zellrasen gelöst, vereinzelt und auf Deckgläschen ausgesät, um Patch-Clamp-Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration durchzuführen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n \geq 6$).

Zusammenfassend konnte ermittelt werden, dass die Vitalität der Zellen mit der Dauer der Kultivierung sinkt. Ein Phänotyp in der BEST1-Kanalfunktion von M. Best-assoziierten hiRPE konnte mittels Kalziumstimulation und nur bei den Zellen identifiziert werden, die nicht passagiert und vormals noch nicht eingefroren waren.

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Actin	HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
ADVIRC	autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie	μ	Micro
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat	hiFib	humane Fibroblasten
ARB	autosomal-rezessive Bestrophinopathie	hiRPE	humanes induziertes retinales Pigmentepithel
ATP	Adenosintriphosphat	HTS	engl. <i>High-Troughput</i> Screening, Hochdrucksatz-Screening
AVMD	Autosomal-dominante vitelliforme Makuladystrophie	HYPO	hypoosmotische Lösung
BEST1	Bestrophin-1	I	Iodid
BD	<i>Best Disease</i>	ISO	isoosmotische Lösung
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>	k	Kilo
BVMD	Best'sche vitelliforme Makuladystrophie	LCA	engl. <i>Leber's Congenital Amorosis</i> , Lebersche Kongenitale Amurose
bzw.	beziehungsweise	M. Best	Morbus Best
bzgl.	bezüglich	MDCKII	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
CAR	engl. <i>Chimeric Antigen Receptor</i>	mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
CAT	Katalase	MRT	Magnetresonanztomografie
cDNA	complementary DNA	n	nano
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>	OCT	optische Kohärenztomographie
Cl⁻	Chlorid	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
/Cas	<i>/ Cas-9 Protein</i>	PET	Positronen-Emissions-Tomografie
CTNNB1	β-Catenin	PFA	Paraformaldehyd
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	POS	engl. <i>Photoreceptor Outer Segments</i> , Außensegmente der Photorezeptoren
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid	RPE	retinales Pigmentepithel
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese
EDTA	Ethyldiamintetraacetat	SE	Standartfehler
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	sec	Sekunde
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur	Selng	<i>The Secret Ingredient</i>
EOG	Elektro-Okulogramm	TBE	<i>Tris Borat EDTA</i>
et al.	et aliter (und andere)	TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>	TEMED	Tetramethylethylenediamin
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomografie	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
g	Gramm	V	Volt
G-418	Geneticin	VEGF	<i>Vascular Edothelial Growth Factor</i>
	Stunde	WT	Wildtyp
sgRNA	Single-Guide-RNA	X. laevis	<i>Xenopus laevis</i>
HCS	High-Content-Screening	YFP	engl. <i>Yellow Fluorescent Protein</i> , gelbes fluoreszierendes Protein

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Reagenzien und Chemikalien.	20
Tabelle 2:	Verwendete Wirkstoffkollektionen.	21
Tabelle 3:	Generierte, stabil <i>BEST1</i> exprimierende MDCKII-Zelllinien.	21
Tabelle 4:	Oligonukleotidpaare zur gezielten Mutagenese.	22
Tabelle 5:	Medien für die MDCKII-Zellkultur.	23
Tabelle 6:	Generierte hiRPE-Zelllinien.	24
Tabelle 7:	Medien für die Generierung und Kultivierung von hiRPE.	25
Tabelle 8:	Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.	27
Tabelle 9:	Primäre Antikörper für Western Blot-Analysen.	28
Tabelle 10:	Sekundäre Antikörper für Western Blot-Analysen.	28
Tabelle 11:	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE-Protein-Analyse.	28
Tabelle 12:	Lösungen für Immunozytochemische Färbungen.	29
Tabelle 13:	Primäre Antikörper für immunozytochemische Färbungen.	29
Tabelle 14:	Sekundäre Antikörper für immunozytochemische Färbungen.	29
Tabelle 15:	Lösungen für den Halogenidtransport-Assay.	31
Tabelle 16:	Komponenten des Patch-Clamp-Setups.	32
Tabelle 17:	Lösungen für Patch-Clamp-Messungen.	33
Tabelle 18:	Getestete Lösungen zum Etablieren der Patch-Clamp-Messungen.	33
Tabelle 19:	Lösungen für Zellvolumen-Messungen.	35
Tabelle 20:	Antikörper-Verdünnungen für den Lokalisations-Assay.	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Klinische Darstellung des M. Best.	12
Abbildung 2:	Anomales Arden-Verhältnis im EOG eines M. Best-Patienten.	13
Abbildung 3:	BEST1-Proteinstruktur.	15
Abbildung 4:	Neu installiertes <i>Patch-Clamp</i> -Setup am Institut für Humangenetik.	31
Abbildung 5:	Applikation der MDCKII-Zellen auf 384-Well-Assay-Platten.	35
Abbildung 6:	Lokalisation ausgewählter BEST1-Mutationen im 3D-Strukturmodell und <i>BEST1</i> -Expression in generierten MDCKII-Zelllinien.	39
Abbildung 7:	Lokalisation von BEST1-Mutationen rekrutierter M. Best-Patienten im 3D-Strukturmodell und <i>BEST1</i> -Expression in generierten hiRPE.	40
Abbildung 8:	BEST1-Proteinlokalisierung im MDCKII-Zellsystem.	41
Abbildung 9:	BEST1-Proteinlokalisierung in hiRPE.	41
Abbildung 10:	Intrazelluläre YFP-Expression in MDCKII-Zelllinien.	42
Abbildung 11:	Graphische Darstellung des Halogenidtransport-Assay-Prinzips.	43
Abbildung 12:	BEST1-Kanalfunktion in generierten MDCKII-Zelllinien anhand des Halogenidtransport-Assays.	43
Abbildung 13:	Analyse der BEST1-Kanalfunktion in hiRPE über <i>Patch-Clamp</i> -Messungen in der <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration.	44
Abbildung 14:	POS-Degradation in hiRPE.	45
Abbildung 15:	Biopartikel-Phagozytose in hiRPE.	46
Abbildung 16:	Zellvolumenregulation in hiRPE.	48
Abbildung 17:	Zellvolumina der hiRPE.	48
Abbildung 18:	Wildtypische und mutierte BEST1-Lokalisation über mehrere, unabhängige MDCKII-Zelllinien hinweg.	50
Abbildung 19:	Aufbau der Hochdurchsatz-geeigneten Lokalisations-Assay-Plattform.	51
Abbildung 20:	Verfahren zur Bildanalyse der Lokalisations-Assay-Plattform.	52
Abbildung 21:	Roboterautomatisierte Unterscheidung von Zellen mit wildtypischer und mutanter BEST1-Lokalisation im 384-Well-Format.	53
Abbildung 22:	BEST1-Halogenidtransport in mehreren, unabhängigen MDCKII-Zelllinien.	54
Abbildung 23:	Aufbau der Hochdurchsatz-geeigneten Halogenidtransport-Assay-Plattform.	55
Abbildung 24:	Prinzip des Aufbaus und der Analyse der BEST1-Kanalfunktion mittels Halogenidtransport-Assay.	55
Abbildung 25:	Primäres Screening der 2.645 Wirkstoff-Kollektion über die Lokalisations- Assay-Plattform.	57
Abbildung 26:	Lokalisation vom mutierten BEST1 nach Behandlung mit positiven Treffern des primären Screenings bzgl. eines BEST1-Korrektors.	58
Abbildung 27.:	Übersicht über die Schritte des Wirkstoff-Screenings auf der Suche nach einem BEST1- <i>Potentiator</i> .	59

Abbildung 28:	Primäres Screening mittels Halogenidtransport-Assay-Plattform.	60
Abbildung 29:	Triplikate der positiven Treffer des primären Screenings bzgl. eines BEST1- <i>Potentiators</i> .	61
Abbildung 30:	Wirkstoffeffekt auf BEST1-Lokalisation und Zellverband.	61
Abbildung 31:	Wirkstoffeffekte auf untransfizierte MDCKII und MDCKII-BEST1-WT.	62
Abbildung 32:	Wirksamkeit von <i>SelNg</i> auf mutiertes BEST1 in mehreren Konzentrationen.	62
Abbildung 33:	Wirksamkeit von <i>SelNg</i> auf den BEST1-Anionentransport in mehreren pathogenen BEST1-Varianten.	63
Abbildung 34:	Einfluss von <i>SelNg</i> auf die BEST1-Chloridleitfähigkeit in hiRPE.	64
Abbildung 35:	Zellpräparation der hiRPE für <i>Patch-Clamp</i> -Messungen.	77
Abbildung 36:	Zellkapazität und Ausgangs-Anionenstrom der hiRPE-Zelllinien.	78
Abbildung 37:	Auswirkung verschiedener Stimulatoren bzw. Zellpräoperationen auf Anionenströme in hiRPE.	79
Abbildung 38:	Auswirkung verschiedener Stimulatoren bzw. Zellpräoperationen auf die Kinetik der Anionenströme in hiRPE.	79

Literaturverzeichnis

- Accurso, Frank J.; Rowe, Steven M.; Clancy, J. P.; Boyle, Michael P.; Dunitz, Jordan M.; Durie, Peter R. et al. (2010): Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. In: *The New England journal of medicine* 363 (21), S. 1991–2003. DOI: 10.1056/NEJMoa0909825.
- Accurso, Frank J.; van Goor, Fredrick; Zha, Juhong; Stone, Anne J.; Dong, Qunming; Ordonez, Claudia L. et al. (2014): Sweat chloride as a biomarker of CFTR activity: proof of concept and ivacaftor clinical trial data. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 13 (2), S. 139–147. DOI: 10.1016/j.jcf.2013.09.007.
- Allikmets, R.; Seddon, J. M.; Bernstein, P. S.; Hutchinson, A.; Atkinson, A.; Sharma, S. et al. (1999): Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies. In: *Human genetics* 104 (6), S. 449–453. DOI: 10.1007/s004390050986.
- Al-Zaidy, Samiah; Pickard, A. Simon; Kotha, Kavitha; Alfano, Lindsay N.; Lowes, Linda; Paul, Grace et al. (2019): Health outcomes in spinal muscular atrophy type 1 following AVXS-101 gene replacement therapy. In: *Pediatric pulmonology* 54 (2), S. 179–185. DOI: 10.1002/ppul.24203.
- Andtbacka, Robert H. I.; Kaufman, Howard L.; Collichio, Frances; Amatruda, Thomas; Senzer, Neil; Chesney, Jason et al. (2015): Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (25), S. 2780–2788. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.3377.
- Arevalo, J. Fernando (2013): Intravitreal bevacizumab as anti-vascular endothelial growth factor in the management of complications of proliferative diabetic retinopathy. In: *Medical hypothesis, discovery & innovation ophthalmology journal* 2 (1), S. 20–24.
- Ashtari, Manzar; Cyckowski, Laura L.; Monroe, Justin F.; Marshall, Kathleen A.; Chung, Daniel C.; Auricchio, Alberto et al. (2011): The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (6), S. 2160–2168. DOI: 10.1172/JCI57377.
- Bakall, B.; Radu, R. A.; Stanton, J. B.; Burke, J. M.; McKay, B. S.; Wadelius, C. et al. (2007): Enhanced accumulation of A2E in individuals homozygous or heterozygous for mutations in BEST1 (VMD2). In: *Experimental eye research* 85 (1), S. 34–43. DOI: 10.1016/j.exer.2007.02.018.
- Bard, L. A.; Cross, H. E. (1975): Genetic counseling of families with Best macular dystrophy. In: *Transactions. Section on Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology* 79 (6), OP865–73.
- Bennett, Jean; Wellman, Jennifer; Marshall, Kathleen A.; McCague, Sarah; Ashtari, Manzar; DiStefano-Pappas, Julie et al. (2016): Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. In: *Lancet* 388 (10045), S. 661–672. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30371-3.
- Best, Friedrich (1905): Über eine hereditare Maculaaffektion. Beitrag zur Vererbungslehre. In: *Z Augenheilk*, 13:199–212
- Bitner, Hanna; Mizrahi-Meissonnier, Liliana; Griefner, Gabriel; Erdinest, Inbar; Sharon, Dror; Banin, Eyal (2011): A homozygous frameshift mutation in BEST1 causes the classical form of Best disease in an autosomal recessive mode. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (8), S. 5332–5338. DOI: 10.1167/iovs.11-7174.
- Bitner, Hanna; Schatz, Patrik; Mizrahi-Meissonnier, Liliana; Sharon, Dror; Rosenberg, Thomas (2012): Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark. In: *American journal of ophthalmology* 154 (2), 403-412.e4. DOI: 10.1016/j.ajo.2012.02.036.
- Boon, Camiel J. F.; Theelen, Thomas; Hoefsloot, Elisabeth H.; van Schooneveld, Mary J.; Keunen, Jan E. E.; Cremers, Frans P. M. et al. (2009): Clinical and molecular genetic analysis of best vitelliform macular dystrophy. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 29 (6), S. 835–847. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31819d4fda.
- Boutros, Michael; Heigwer, Florian; Laufer, Christina (2015): Microscopy-Based High-Content Screening. In: *Cell* 163 (6), S. 1314–1325. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.007.

- Brandl, Caroline; Zimmermann, Stephanie J.; Milenkovic, Vladimir M.; Rosendahl, Sibylle M. G.; Grassmann, Felix; Milenkovic, Andrea et al. (2014): In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). In: *Neuromolecular medicine* 16 (3), S. 551–564. DOI: 10.1007/s12017-014-8308-8.
- Brown, David M.; Chen, Eric; Mariani, Angeline; Major, James C., JR (2013): Super-dose anti-VEGF (SAVE) trial: 2.0 mg intravitreal ranibizumab for recalcitrant neovascular macular degeneration-primary end point. In: *Ophthalmology* 120 (2), S. 349–354. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.08.008.
- Buchholz, David E.; Pennington, Britney O.; Croze, Roxanne H.; Hinman, Cassidy R.; Coffey, Peter J.; Clegg, Dennis O. (2013): Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. In: *Stem cells translational medicine* 2 (5), S. 384–393. DOI: 10.5966/sctm.2012-0163.
- Burgess, Rosemary; Millar, Ian D.; Leroy, Bart P.; Urquhart, Jill E.; Fearon, Ian M.; Baere, Elfrida de et al. (2008): Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. In: *American journal of human genetics* 82 (1), S. 19–31. DOI: 10.1016/j.ajhg.2007.08.004.
- Cai, Zhiwei; Scott-Ward, Toby S.; Li, Hongyu; Schmidt, Andre; Sheppard, David N. (2004): Strategies to investigate the mechanism of action of CFTR modulators. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 3 Suppl 2, S. 141–147. DOI: 10.1016/j.jcf.2004.05.030.
- Caspi, Rachel R. (2006): Ocular autoimmunity: the price of privilege? In: *Immunological reviews* 213, S. 23–35. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00439.x.
- Chien, Li-Ting; Hartzell, H. Criss (2007): Drosophila bestrophin-1 chloride current is dually regulated by calcium and cell volume. In: *The Journal of general physiology* 130 (5), S. 513–524. DOI: 10.1085/jgp.200709795.
- Chien, Li-Ting; Zhang, Zhi-Ren; Hartzell, H. Criss (2006): Single Cl⁻ channels activated by Ca²⁺ in Drosophila S2 cells are mediated by bestrophins. In: *The Journal of general physiology* 128 (3), S. 247–259. DOI: 10.1085/jgp.200609581.
- Ciulla, T. A.; Frederick, A. R., JR (1997): Acute progressive multifocal Best's disease in a 61-year-old man. In: *American journal of ophthalmology* 123 (1), S. 129–131. DOI: 10.1016/s0002-9394(14)71007-4.
- Clancy, J. P.; Rowe, Steven M.; Accurso, Frank J.; Aitken, Moira L.; Amin, Raouf S.; Ashlock, Melissa A. et al. (2012): Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. In: *Thorax* 67 (1), S. 12–18. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2011-200393.
- Dalemans, W.; Barbry, P.; Champigny, G.; Jallat, S.; Dott, K.; Dreyer, D. et al. (1991): Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. In: *Nature* 354 (6354), S. 526–528. DOI: 10.1038/354526a0.
- Davidson, Alice E.; Millar, Ian D.; Burgess-Mullan, Rosemary; Maher, Geoffrey J.; Urquhart, Jill E.; Brown, Peter D. et al. (2011): Functional characterization of bestrophin-1 missense mutations associated with autosomal recessive bestrophinopathy. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (6), S. 3730–3736. DOI: 10.1167/iovs.10-6707.
- Davidson, Alice E.; Millar, Ian D.; Urquhart, Jill E.; Burgess-Mullan, Rosemary; Shweikh, Yusrah; Parry, Neil et al. (2009): Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. In: *American journal of human genetics* 85 (5), S. 581–592. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.09.015.
- Davies, Jane C.; Moskowitz, Samuel M.; Brown, Cynthia; Horsley, Alexander; Mall, Marcus A.; McKone, Edward F. et al. (2018): VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. In: *The New England journal of medicine* 379 (17), S. 1599–1611. DOI: 10.1056/NEJMoa1807119.
- DeWitt, Mark A.; Magis, Wendy; Bray, Nicolas L.; Wang, Tianjiao; Berman, Jennifer R.; Urbinati, Fabrizia et al. (2016): Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. In: *Science translational medicine* 8 (360), 360ra134. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf9336.

- Donato, M. Teresa; Tolosa, Laia; Jimenez, Nuria; Castell, Jose V.; Gomez-Lechon, M. Jose (2012): High-content imaging technology for the evaluation of drug-induced steatosis using a multiparametric cell-based assay. In: *Journal of biomolecular screening* 17 (3), S. 394–400. DOI: 10.1177/1087057111427586.
- Duran, Carlos E.; Azermai, Majda; Vander Stichele, Robert H. (2013): Systematic review of anticholinergic risk scales in older adults. In: *European journal of clinical pharmacology* 69 (7), S. 1485–1496. DOI: 10.1007/s00228-013-1499-3.
- Eder, Jorg; Sedrani, Richard; Wiesmann, Christian (2014 Aug): The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. England.
- Elman, Michael J.; Aiello, Lloyd Paul; Beck, Roy W.; Bressler, Neil M.; Bressler, Susan B.; Edwards, Allison R. et al. (2010): Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. In: *Ophthalmology* 117 (6), 1064–1077.e35. DOI: 10.1016/j.ophtha.2010.02.031.
- Fischmeister, Rodolphe; Hartzell, H. Criss (2005): Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels. In: *The Journal of physiology* 562 (Pt 2), S. 477–491. DOI: 10.1113/j.physiol.2004.075622.
- Fletcher, Erica L.; Jobling, Andrew I.; Vessey, Kirstan A.; Luu, Chi; Guymer, Robyn H.; Baird, Paul N. (2011): Animal models of retinal disease. In: *Progress in molecular biology and translational science* 100, S. 211–286. DOI: 10.1016/B978-0-12-384878-9.00006-6.
- Friedman, E. (2004): Update of the vascular model of AMD. In: *The British journal of ophthalmology* 88 (2), S. 161–163. DOI: 10.1136/bjo.2003.036277.
- Galietta, L. J.; Haggie, P. M.; Verkman, A. S. (2001): Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. In: *FEBS letters* 499 (3), S. 220–224. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02561-3.
- George, Lindsey A.; Sullivan, Spencer K.; Giermasz, Adam; Rasko, John E. J.; Samelson-Jones, Benjamin J.; Ducore, Jonathan et al. (2017): Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. In: *The New England journal of medicine* 377 (23), S. 2215–2227. DOI: 10.1056/NEJMoa1708538.
- Giannelli, Serena G.; Luoni, Mirko; Castoldi, Valerio; Massimino, Luca; Cabassi, Tommaso; Angeloni, Debora et al. (2018): Cas9/sgRNA selective targeting of the P23H Rhodopsin mutant allele for treating retinitis pigmentosa by intravitreal AAV9.PHP.B-based delivery. In: *Human molecular genetics* 27 (5), S. 761–779. DOI: 10.1093/hmg/ddx438.
- Graeber, Simon Y.; Dopfer, Christian; Naehrlich, Lutz; Gyulumyan, Lena; Scheuermann, Heike; Hirtz, Stephanie et al. (2018): Effects of Lumacaftor-Ivacaftor Therapy on Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Phe508del Homozygous Patients with Cystic Fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 197 (11), S. 1433–1442. DOI: 10.1164/rccm.201710-1983OC.
- Grisanti, S. (1998): Immune privilege of the eye. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 95 (2), S. 124–135. DOI: 10.1007/s003470050250.
- Gullstrand A (1910). Neue Methoden der Reflexlosen Ophthalmoskopie. Berichte Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft 36.
- Guziewicz, Karina E.; Cideciyan, Artur V.; Beltran, William A.; Komaromy, Andras M.; Dufour, Valerie L.; Swider, Malgorzata et al. (2018): BEST1 gene therapy corrects a diffuse retina-wide microdetachment modulated by light exposure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (12), E2839-E2848. DOI: 10.1073/pnas.1720662115.
- Guziewicz, Karina E.; Zangerl, Barbara; Lindauer, Sarah J.; Mullins, Robert F.; Sandmeyer, Lynne S.; Grahn, Bruce H. et al. (2007): Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 48 (5), S. 1959–1967. DOI: 10.1167/iovs.06-1374.
- Hartzell, H. Criss; Qu, Zhiqiang; Yu, Kuai; Xiao, Qinghuan; Chien, Li-Ting (2008): Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. In: *Physiological reviews* 88 (2), S. 639–672. DOI: 10.1152/physrev.00022.2007.

- Hayami, M.; Decock, Chr; Brabant, P.; van Kerckhoven, W.; Lafaut, B. A.; Laey, J. J. de (2003): Optical coherence tomography of adult-onset vitelliform dystrophy. In: *Bulletin de la Societe belge d'ophtalmologie* (289), S. 53–61.
- Hoffmann, Ingo; Guziewicz, Karina E.; Zangerl, Barbara; Aguirre, Gustavo D.; Mardin, Christian Y. (2012): Canine multifocal retinopathy in the Australian Shepherd: a case report. In: *Veterinary ophthalmology* 15 Suppl 2, S. 134–138. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2012.01005.x.
- Huang, D.; Swanson, E. A.; Lin, C. P.; Schuman, J. S.; Stinson, W. G.; Chang, W. et al. (1991): Optical coherence tomography. In: *Science (New York, N.Y.)* 254 (5035), S. 1178–1181. DOI: 10.1126/science.1957169.
- Humayun, Mark S.; Dorn, Jessy D.; da Cruz, Lyndon; Dagnelie, Gislin; Sahel, Jose-Alain; Stanga, Paulo E. et al. (2012): Interim results from the international trial of Second Sight's visual prosthesis. In: *Ophthalmology* 119 (4), S. 779–788. DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.09.028.
- Jayaraman, S.; Haggie, P.; Wachter, R. M.; Remington, S. J.; Verkman, A. S. (2000): Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (9), S. 6047–6050. DOI: 10.1074/jbc.275.9.6047.
- Jayaraman, S.; Teitler, L.; Skalski, B.; Verkman, A. S. (1999): Long-wavelength iodide-sensitive fluorescent indicators for measurement of functional CFTR expression in cells. In: *The American journal of physiology* 277 (5), C1008-18. DOI: 10.1152/ajpcell.1999.277.5.C1008.
- Jentsch, Thomas J.; Poet, Mallorie; Fuhrmann, Jens C.; Zdebik, Anselm A. (2005): Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. In: *Annual review of physiology* 67, S. 779–807. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.032003.153245.
- Ji, Changyi; Li, Yao; Kittredge, Alec; Hopiavuori, Austin; Ward, Nancy; Yao, Peng et al. (2019): Investigation and Restoration of BEST1 Activity in Patient-derived RPEs with Dominant Mutations. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 19026. DOI: 10.1038/s41598-019-54892-7.
- Johnson, Adiv A.; Guziewicz, Karina E.; Lee, C. Justin; Kalathur, Ravi C.; Pulido, Jose S.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2017): Bestrophin 1 and retinal disease. In: *Progress in retinal and eye research* 58, S. 45–69. DOI: 10.1016/j.preteyes.2017.01.006.
- Johnson, Adiv A.; Lee, Yong-Suk; Chadburn, Andrew J.; Tammaro, Paolo; Manson, Forbes D.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2014): Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1. In: *Experimental eye research* 121, S. 74–85. DOI: 10.1016/j.exer.2014.02.006.
- Johnson, Adiv A.; Lee, Yong-Suk; Stanton, J. Brett; Yu, Kuai; Hartzell, Criss H.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2013): Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. In: *Human molecular genetics* 22 (23), S. 4688–4697. DOI: 10.1093/hmg/ddt316.
- Kane Dickson, Veronica; Pedi, Leanne; Long, Stephen B. (2014): Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel. In: *Nature* 516 (7530), S. 213–218. DOI: 10.1038/nature13913.
- Kaufman, S. J.; Goldberg, M. F.; Orth, D. H.; Fishman, G. A.; Tessler, H.; Mizuno, K. (1982): Autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 100 (2), S. 272–278. DOI: 10.1001/archopht.1982.01030030274008.
- Kaufmann, Horacio; Norcliffe-Kaufmann, Lucy; Palma, Jose-Alberto (2015): Droxidopa in neurogenic orthostatic hypotension. In: *Expert review of cardiovascular therapy* 13 (8), S. 875–891. DOI: 10.1586/14779072.2015.1057504.
- Kawanaka, Norikuni; Taylor, Andrew W. (2011): Localized retinal neuropeptide regulation of macrophage and microglial cell functionality. In: *Journal of neuroimmunology* 232 (1-2), S. 17–25. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.09.025.
- Kintaka, Reiko; Makanae, Koji; Moriya, Hisao (2016): Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes. In: *Scientific reports* 6, S. 31774. DOI: 10.1038/srep31774.
- Korobelnik, Jean-Francois; Do, Diana V.; Schmidt-Erfurth, Ursula; Boyer, David S.; Holz, Frank G.; Heier, Jeffrey S. et al. (2014): Intravitreal afibbercept for diabetic macular edema. In: *Ophthalmology* 121 (11), S. 2247–2254. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.05.006.

- Krämer, F.; White, K.; Pauleikhoff, D.; Gehrig, A.; Passmore, L.; Rivera, A. et al. (2000): 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. In: *European journal of human genetics : EJHG* 8 (4), S. 286–292. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200447.
- Krohne, Tim U.; Westenskow, Peter D.; Kurihara, Toshihide; Friedlander, David F.; Lehmann, Mandy; Dorsey, Alison L. et al. (2012): Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. In: *Stem cells translational medicine* 1 (2), S. 96–109. DOI: 10.5966/sctm.2011-0057.
- La Fuente, Ricardo de; Namkung, Wan; Mills, Aaron; Verkman, A. S. (2008): Small-molecule screen identifies inhibitors of a human intestinal calcium-activated chloride channel. In: *Molecular pharmacology* 73 (3), S. 758–768. DOI: 10.1124/mol.107.043208.
- Lacassagne, Emmanuelle; Dhuez, Aurore; Rigaudiere, Florence; Dansault, Anouk; Vélu, Christelle; Bigot, Karine et al. (2011): Phenotypic variability in a French family with a novel mutation in the BEST1 gene causing multifocal best vitelliform macular dystrophy. In: *Molecular vision* 17, S. 309–322.
- Laine, Christine M.; Joeng, Kyu Sang; Campeau, Philippe M.; Kiviranta, Riku; Tarkkonen, Kati; Grover, Monica et al. (2013): WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. In: *The New England journal of medicine* 368 (19), S. 1809–1816. DOI: 10.1056/NEJMoa1215458.
- Laird, P. W.; Zijderveld, A.; Linders, K.; Rudnicki, M. A.; Jaenisch, R.; Berns, A. (1991): Simplified mammalian DNA isolation procedure. In: *Nucleic acids research* 19 (15), S. 4293. DOI: 10.1093/nar/19.15.4293.
- Lamb, Trevor D.; Collin, Shaun P.; Pugh, Edward N., JR (2007): Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. In: *Nature reviews. Neuroscience* 8 (12), S. 960–976. DOI: 10.1038/nrn2283.
- Lang, F.; Busch, G. L.; Ritter, M.; Volkl, H.; Waldegg, S.; Gulbins, E.; Haussinger, D. (1998): Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. In: *Physiological reviews* 78 (1), S. 247–306. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.1.247.
- Lau, Chun H.; Taylor, Andrew W. (2009): The immune privileged retina mediates an alternative activation of J774A.1 cells. In: *Ocular immunology and inflammation* 17 (6), S. 380–389. DOI: 10.3109/09273940903118642.
- Lee, Soojung; Yoon, Bo-Eun; Berglund, Ken; Oh, Soo-Jin; Park, Hyungju; Shin, Hee-Sup et al. (2010): Channel-mediated tonic GABA release from glia. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6005), S. 790–796. DOI: 10.1126/science.1184334.
- Li, Xingya; Wang, Yafei; Urso, David; O'Rourke, James; Cone, Robert E. (2004): Thymocytes induced by antigen injection into the anterior chamber activate splenic CD8+ suppressor cells and enhance the antigen-induced production of immunoglobulin G1 antibodies. In: *Immunology* 113 (1), S. 44–56. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01928.x.
- Li, Yao; Zhang, Yu; Xu, Yu; Kittridge, Alec; Ward, Nancy; Chen, Shoudeng et al. (2017): Patient-specific mutations impair BESTROPHIN1's essential role in mediating Ca(2+)-dependent Cl(-) currents in human RPE. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.29914.
- Ma, Tonghui; Thiagarajah, Jay R.; Yang, Hong; Sonawane, Nitin D.; Folli, Chiara; Galietta, Luis J. V.; Verkman, A. S. (2002): Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. In: *The Journal of clinical investigation* 110 (11), S. 1651–1658. DOI: 10.1172/JCI16112.
- Maeder, Morgan L.; Stefanidakis, Michael; Wilson, Christopher J.; Baral, Reshma; Barrera, Luis Alberto; Bounoutas, George S. et al. (2019): Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. In: *Nature medicine* 25 (2), S. 229–233. DOI: 10.1038/s41591-018-0327-9.
- Maguire, Albert M.; High, Katherine A.; Auricchio, Alberto; Wright, J. Fraser; Pierce, Eric A.; Testa, Francesco et al. (2009): Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. In: *Lancet* 374 (9701), S. 1597–1605. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61836-5.

- Maguire, Albert M.; Simonelli, Francesca; Pierce, Eric A.; Pugh, Edward N., JR; Mingozi, Federico; Bennicelli, Jeannette et al. (2008): Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. In: *The New England journal of medicine* 358 (21), S. 2240–2248. DOI: 10.1056/NEJMoa0802315.
- Marmorstein, A. D.; Marmorstein, L. Y.; Rayborn, M.; Wang, X.; Hollyfield, J. G.; Petrukhin, K. (2000): Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23), S. 12758–12763. DOI: 10.1073/pnas.220402097.
- Marmorstein, Alan D.; Cross, Harold E.; Peachey, Neal S. (2009): Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (3), S. 206–226. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.04.004.
- Marmorstein, Alan D.; Kinnick, Tyson R.; Stanton, J. Brett; Johnson, Adiv A.; Lynch, Ronald M.; Marmorstein, Lihua Y. (2015): Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelium. In: *Molecular vision* 21, S. 347–359.
- Marmorstein, Alan D.; Stanton, J. Brett; Yocom, John; Bakall, Benjamin; Schiavone, Marc T.; Wadelius, Claes et al. (2004): A model of best vitelliform macular dystrophy in rats. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 45 (10), S. 3733–3739. DOI: 10.1167/iovs.04-0307.
- Marmorstein, Lihua Y.; Wu, Jiang; McLaughlin, Precious; Yocom, John; Karl, Mike O.; Neussert, Rudgar et al. (2006): The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1). In: *The Journal of general physiology* 127 (5), S. 577–589. DOI: 10.1085/jgp.200509473.
- Marquardt, A.; Stohr, H.; Passmore, L. A.; Kramer, F.; Rivera, A.; Weber, B. H. (1998): Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). In: *Human molecular genetics* 7 (9), S. 1517–1525. DOI: 10.1093/hmg/7.9.1517.
- Maruotti, Julien; Wahlin, Karl; Gorrell, David; Bhutto, Imran; Lutty, Gerard; Zack, Donald J. (2013): A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. In: *Stem cells translational medicine* 2 (5), S. 341–354. DOI: 10.5966/sctm.2012-0106.
- Maude, Shannon L.; Teachey, David T.; Porter, David L.; Grupp, Stephan A. (2015): CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 125 (26), S. 4017–4023. DOI: 10.1182/blood-2014-12-580068.
- Medawar, P. B. (1948): Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. In: *British journal of experimental pathology* 29 (1), S. 58–69.
- Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Milenkovic, Vladimir M.; Jendryke, Thomas; Sirianant, Lalida; Wanitchakool, Potchanart et al. (2015): Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (20), E2630-9. DOI: 10.1073/pnas.1418840112.
- Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Nachtigal, Anna-Lena; Kellner, Ulrich; Weber, Bernhard H. F. (2020): Mutation-Dependent Mechanisms and Their Impact on Targeted Therapeutic Strategies with Reference to Bestrophin 1 and the Bestrophinopathies. In: *Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde*. DOI: 10.1055/a-1065-2129.
- Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Nachtigal, Anna-Lena; Kellner, Ulrich; Weber, Bernhard H. F. (2020): Mutation-Dependent Mechanisms and Their Impact on Targeted Therapeutic Strategies with Reference to Bestrophin 1 and the Bestrophinopathies. In: *Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde* 237 (3), S. 259–266. DOI: 10.1055/a-1065-2129.
- Milenkovic, Andrea; Milenkovic, Vladimir M.; Wetzel, Christian H.; Weber, Bernhard H. F. (2018): BEST1 protein stability and degradation pathways differ between autosomal dominant Best disease and autosomal recessive bestrophinopathy accounting for the distinct retinal phenotypes. In: *Human molecular genetics* 27 (9), S. 1630–1641. DOI: 10.1093/hmg/ddy070.

- Milenkovic, Andrea; Schmied, Denise; Tanimoto, Naoyuki; Seeliger, Mathias W.; Sparrow, Janet R.; Weber, Bernhard H. F. (2019): The Y227N mutation affects bestrophin-1 protein stability and impairs sperm function in a mouse model of Best vitelliform macular dystrophy. In: *Biology open* 8 (7). DOI: 10.1242/bio.041335.
- Milenkovic, Vladimir M.; Rohrl, Elena; Weber, Bernhard H. F.; Strauss, Olaf (2011): Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 17), S. 2988–2996. DOI: 10.1242/jcs.085878.
- Miller, Alexandria N.; Vaisey, George; Long, Stephen B. (2019): Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin. In: *eLife* 8. DOI: 10.7554/eLife.43231.
- Mohler, C. W.; Fine, S. L. (1981): Long-term evaluation of patients with Best's vitelliform dystrophy. In: *Ophthalmology* 88 (7), S. 688–692. DOI: 10.1016/s0161-6420(81)34965-3.
- Moran, Antoinette; Dunitz, Jordan; Nathan, Brandon; Saeed, Asad; Holme, Bonnie; Thomas, William (2009): Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. In: *Diabetes care* 32 (9), S. 1626–1631. DOI: 10.2337/dc09-0586.
- Moshfegh, Yasmin; Velez, Gabriel; Li, Yao; Bassuk, Alexander G.; Mahajan, Vinit B.; Tsang, Stephen H. (2016): BESTROPHIN1 mutations cause defective chloride conductance in patient stem cell-derived RPE. In: *Human molecular genetics* 25 (13), S. 2672–2680. DOI: 10.1093/hmg/ddw126.
- Mujat, Mircea; Ferguson, R. Daniel; Hammer, Daniel X.; Gittins, Christopher; Iftimia, Nicusor (2009): Automated algorithm for breast tissue differentiation in optical coherence tomography. In: *Journal of biomedical optics* 14 (3), S. 34040. DOI: 10.1117/1.3156821.
- Mullins, Robert F.; Kuehn, Markus H.; Faidley, Elizabeth A.; Syed, Nasreen A.; Stone, Edwin M. (2007): Differential macular and peripheral expression of bestrophin in human eyes and its implication for best disease. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 48 (7), S. 3372–3380. DOI: 10.1167/iovs.06-0868.
- Mullins, Robert F.; Oh, Kean T.; Heffron, Edward; Hageman, Gregory S.; Stone, Edwin M. (2005): Late development of vitelliform lesions and flecks in a patient with best disease: clinicopathologic correlation. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 123 (11), S. 1588–1594. DOI: 10.1001/archoph.123.11.1588.
- Nachtigal, Anna-Lena; Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Schulz, Heidi L.; Duerr, Lisa M. J.; Lang, Gabriele E. et al. (2020): Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. In: *International journal of molecular sciences* 21 (5). DOI: 10.3390/ijms21051597.
- Neelapu, Sattva S.; Locke, Frederick L.; Bartlett, Nancy L.; Lekakis, Lazaros J.; Miklos, David B.; Jacobson, Caron A. et al. (2017): Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 377 (26), S. 2531–2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
- Nierobisz, Lidia S.; Cheatham, Bentley; Buehrer, Benjamin M.; Sexton, Jonathan Z. (2013): High-content screening of human primary muscle satellite cells for new therapies for muscular atrophy/dystrophy. In: *Current chemical genomics and translational medicine* 7, S. 21–29. DOI: 10.2174/2213988501307010021.
- Nordstrom, S. (1974): Hereditary macular degeneration--a population survey in the country of Vsterbotten, Sweden. In: *Hereditas* 78 (1), S. 41–62. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1974.tb01427.x.
- Nordstrom, S.; Thorburn, W. (1980): Dominantly inherited macular degeneration (Best's disease) in a homozygous father with 11 children. In: *Clinical genetics* 18 (3), S. 211–216. DOI: 10.1111/j.1399-0004.1980.tb00874.x.
- Okita, Keisuke; Yamakawa, Tatsuya; Matsumura, Yasuko; Sato, Yoshiko; Amano, Naoki; Watanabe, Akira et al. (2013): An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31 (3), S. 458–466. DOI: 10.1002/stem.1293.
- Pedemonte, Nicoletta; Galietta, Luis J. V. (2012): Pharmacological Correctors of Mutant CFTR Mistrafficking. In: *Frontiers in pharmacology* 3, S. 175. DOI: 10.3389/fphar.2012.00175.
- Petrushkin, K.; Koisti, M. J.; Bakall, B.; Li, W.; Xie, G.; Marknell, T. et al. (1998): Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. In: *Nature genetics* 19 (3), S. 241–247. DOI: 10.1038/915.

- Rajendram, Ranjan; Fraser-Bell, Samantha; Kaines, Andrew; Michaelides, Michel; Hamilton, Robin D.; Degli Esposti, Simona et al. (2012): A 2-year prospective randomized controlled trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy (BOLT) in the management of diabetic macular edema: 24-month data: report 3. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 130 (8), S. 972–979. DOI: 10.1001/archophthalmol.2012.393.
- Ravin, Suk See de; Li, Linhong; Wu, Xiaolin; Choi, Uimook; Allen, Cornell; Koontz, Sherry et al. (2017): CRISPR-Cas9 gene repair of hematopoietic stem cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. In: *Science translational medicine* 9 (372). DOI: 10.1126/scitranslmed.aah3480.
- Rhim, Ji Heon; Luo, Xiangjian; Xu, Xiaoyun; Gao, Dongbing; Zhou, Tieling; Li, Fuhai et al. (2015): A High-content screen identifies compounds promoting the neuronal differentiation and the midbrain dopamine neuron specification of human neural progenitor cells. In: *Scientific reports* 5, S. 16237. DOI: 10.1038/srep16237.
- Russell, Stephen; Bennett, Jean; Wellman, Jennifer A.; Chung, Daniel C.; Yu, Zi-Fan; Tillman, Amy et al. (2017): Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. In: *Lancet* 390 (10097), S. 849–860. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31868-8.
- Simonelli, Francesca; Maguire, Albert M.; Testa, Francesco; Pierce, Eric A.; Mingozzi, Federico; Bennicelli, Jeannette L. et al. (2010): Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (3), S. 643–650. DOI: 10.1038/mt.2009.277.
- Singh, Ruchira; Kuai, David; Guziewicz, Karina E.; Meyer, Jackelyn; Wilson, Molly; Lu, Jianfeng et al. (2015): Pharmacological Modulation of Photoreceptor Outer Segment Degradation in a Human iPS Cell Model of Inherited Macular Degeneration. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (11), S. 1700–1711. DOI: 10.1038/mt.2015.141.
- Singh, Ruchira; Shen, Wei; Kuai, David; Martin, Jessica M.; Guo, Xiangrong; Smith, Molly A. et al. (2013): iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. In: *Human molecular genetics* 22 (3), S. 593–607. DOI: 10.1093/hmg/dds469.
- Small, Eric J.; Schellhammer, Paul F.; Higano, Celestia S.; Redfern, Charles H.; Nemunaitis, John J.; Valone, Frank H. et al. (2006): Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (19), S. 3089–3094. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.5252.
- Stingl, Katarina; Bartz-Schmidt, Karl Ulrich; Besch, Dorothea; Braun, Angelika; Bruckmann, Anna; Gekeler, Florian et al. (2013): Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS. In: *Proceedings. Biological sciences* 280 (1757), S. 20130077. DOI: 10.1098/rspb.2013.0077.
- Stotz, Stephanie C.; Clapham, David E. (2012): Anion-sensitive fluorophore identifies the Drosophila swell-activated chloride channel in a genome-wide RNA interference screen. In: *PloS one* 7 (10), e46865. DOI: 10.1371/journal.pone.0046865.
- Streilein, J. W.; Wilbanks, G. A.; Cousins, S. W. (1992): Immunoregulatory mechanisms of the eye. In: *Journal of neuroimmunology* 39 (3), S. 185–200. DOI: 10.1016/0165-5728(92)90253-h.
- Sui, Jinliang; Cotard, Shakira; Andersen, Jennifer; Zhu, Ping; Staunton, Jane; Lee, Margaret; Lin, Stephen (2010): Optimization of a Yellow fluorescent protein-based iodide influx high-throughput screening assay for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators. In: *Assay and drug development technologies* 8 (6), S. 656–668. DOI: 10.1089/adt.2010.0312.
- Suzuki, M.; Morita, T.; Iwamoto, T. (2006): Diversity of Cl(-) channels. In: *Cellular and molecular life sciences : CMS* 63 (1), S. 12–24. DOI: 10.1007/s00018-005-5336-4.
- Takahashi, Kazutoshi; Tanabe, Koji; Ohnuki, Mari; Narita, Megumi; Ichisaka, Tomoko; Tomoda, Kiichiro; Yamanaka, Shinya (2007): Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. In: *Cell* 131 (5), S. 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, Kazutoshi; Yamanaka, Shinya (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (4), S. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

- Tu, Zhidan; Li, Yan; Smith, Dawn; Doller, Catherine; Sugita, Sunao; Chan, Chi-Chao et al. (2012): Myeloid suppressor cells induced by retinal pigment epithelial cells inhibit autoreactive T-cell responses that lead to experimental autoimmune uveitis. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 53 (2), S. 959–966. DOI: 10.1167/iovs.11-8377.
- Uggenti, Carolina; Briant, Kit; Streit, Anne-Kathrin; Thomson, Steven; Koay, Yee Hui; Baines, Richard A. et al. (2016): Restoration of mutant bestrophin-1 expression, localisation and function in a polarised epithelial cell model. In: *Disease models & mechanisms* 9 (11), S. 1317–1328. DOI: 10.1242/dmm.024216.
- Vaisey, George; Long, Stephen B. (2018): An allosteric mechanism of inactivation in the calcium-dependent chloride channel BEST1. In: *The Journal of general physiology* 150 (11), S. 1484–1497. DOI: 10.1085/jgp.201812190.
- Vaisey, George; Miller, Alexandria N.; Long, Stephen B. (2016): Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the bestrophin ion channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (47), E7399-E7408. DOI: 10.1073/pnas.1614688113.
- van Goor, Fredrick; Hadida, Sabine; Grootenhuis, Peter D. J.; Burton, Bill; Cao, Dong; Neuberger, Tim et al. (2009): Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44), S. 18825–18830. DOI: 10.1073/pnas.0904709106.
- van Goor, Fredrick; Hadida, Sabine; Grootenhuis, Peter D. J.; Burton, Bill; Stack, Jeffrey H.; Straley, Kimberly S. et al. (2011): Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (46), S. 18843–18848. DOI: 10.1073/pnas.1105787108.
- van Velthoven, Mirjam E J; Faber, Dirk J.; Verbraak, Frank D.; van Leeuwen, Ton G.; Smet, Marc D. de (2007): Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. In: *Progress in retinal and eye research* 26 (1), S. 57–77. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2006.10.002.
- Wainwright, Claire E.; Elborn, J. Stuart; Ramsey, Bonnie W.; Marigowda, Gautham; Huang, Xiaohong; Cipolli, Marco et al. (2015): Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. In: *The New England journal of medicine* 373 (3), S. 220–231. DOI: 10.1056/NEJMoa1409547.
- Walter, P.; Brunner, R.; Heimann, K. (1994): Atypical presentations of Best's vitelliform macular degeneration: clinical findings in seven cases. In: *German journal of ophthalmology* 3 (6), S. 440–444.
- Walters, S., & Mehta, A. (2007). Epidemiology of cystic fibrosis. In M. Hodson, D. Geddes, A. Bush (Eds.), *Cystic fibrosis* (3rd ed., pp. 21-45). London: Hodder Arnold.
- Weingeist, T. A.; Kobrin, J. L.; Watzke, R. C. (1982): Histopathology of Best's macular dystrophy. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 100 (7), S. 1108–1114. DOI: 10.1001/archopht.1982.01030040086016.
- Wetterauer, B. / Schuster, R. (2008): Seltene Krankheiten: Probleme, Stand und Entwicklung der nationalen und europäischen Forschungsförderung, in: *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, Vol. 51, Nr. 5, S. 519-528.
- Whitton, Maxine E.; Pinart, Mariona; Batchelor, Jonathan; Leonardi-Bee, Jo; Gonzalez, Urba; Jiyad, Zainab et al. (2015 Feb 24): Interventions for vitiligo. England.
- Wittmann, Christine; Reischl, Markus; Shah, Asmi H.; Mikut, Ralf; Liebel, Urban; Grabher, Clemens (2012): Facilitating drug discovery: an automated high-content inflammation assay in zebrafish. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (65), e4203. DOI: 10.3791/4203.
- Wong, Raymond L. M.; Hou, Ping; Choy, Kwong-Wai; Chiang, Sylvia W. Y.; Tam, Pancy O. S.; Li, Haitao et al. (2010): Novel and homozygous BEST1 mutations in Chinese patients with Best vitelliform macular dystrophy. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 30 (5), S. 820–827. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181c700c1.
- Xiao, Qinghuan; Hartzell, H. Criss; Yu, Kuai (2010): Bestrophins and retinopathies. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460 (2), S. 559–569. DOI: 10.1007/s00424-010-0821-5.

- Xiao, Qinghuan; Yu, Kuai; Cui, Yuan-Yuan; Hartzell, H. Criss (2009): Dysregulation of human bestrophin-1 by ceramide-induced dephosphorylation. In: *The Journal of physiology* 587 (Pt 18), S. 4379–4391. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.176800.
- Yang, Tingting; Liu, Qun; Kloss, Brian; Bruni, Renato; Kalathur, Ravi C.; Guo, Youzhong et al. (2014): Structure and selectivity in bestrophin ion channels. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6207), S. 355–359. DOI: 10.1126/science.1259723.
- Yardley, Jill; Leroy, Bart P.; Hart-Holden, Niki; Lafaut, Bart A.; Loeys, Bart; Messiaen, Ludwine M. et al. (2004): Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC). In: *Investigative ophthalmology & visual science* 45 (10), S. 3683–3689. DOI: 10.1167/iovs.04-0550.
- Zamiri, Parisa; Masli, Sharmila; Kitaichi, Nobuyoshi; Taylor, Andrew W.; Streilein, J. Wayne (2005): Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (3), S. 908–919. DOI: 10.1167/iovs.04-0362.
- Zamiri, Parisa; Masli, Sharmila; Streilein, J. Wayne; Taylor, Andrew W. (2006): Pigment epithelial growth factor suppresses inflammation by modulating macrophage activation. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (9), S. 3912–3918. DOI: 10.1167/iovs.05-1267.
- Zangerl, Barbara; Wickstrom, Kaisa; Slavik, Julianna; Lindauer, Sarah J.; Ahonen, Saija; Schelling, Claude et al. (2010): Assessment of canine BEST1 variations identifies new mutations and establishes an independent bestrophinopathy model (cmr3). In: *Molecular vision* 16, S. 2791–2804.
- Zhang, Yu; Kittredge, Alec; Ward, Nancy; Ji, Changyi; Chen, Shoudeng; Yang, Tingting (2018): ATP activates bestrophin ion channels through direct interaction. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3126. DOI: 10.1038/s41467-018-05616-4.
- Zhang, Yu; Kittredge, Alec; Ward, Nancy; Ji, Changyi; Chen, Shoudeng; Yang, Tingting (2018): ATP activates bestrophin ion channels through direct interaction. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3126. DOI: 10.1038/s41467-018-05616-4.
- Zych, Courtney; Domling, Alexander; Ayyavoo, Velpandi (2013): Development of a robust cell-based high-throughput screening assay to identify targets of HIV-1 viral protein R dimerization. In: *Drug design, development and therapy* 7, S. 403–412. DOI: 10.2147/DDDT.S44139.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Bernhard Weber, der es mir ermöglichte, an einem bedeutenden und spannenden Projekt zu arbeiten. Ich bin ihm sehr dankbar dafür, dass er ein großartiges und inspirierendes Arbeitsumfeld geschaffen hat und sein Wissen, seine Erfahrung sowie seine Motivation für die Forschung mit mir geteilt hat.

Ich danke Prof. Dr. Thomas Langmann und Prof. Dr. Rudolf Fuchshofer als meine Mentoren für wertvolles Feedback und Anregungen.

Besonderer Dank gilt meiner Teamleiterin Andrea Milenkovic für das Engagement, das sie in die Betreuung meiner Arbeit gesteckt hat.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Christian Wetzel und auch dem Team um Prof. Dr. Karl Kunzelmann für die Einführung ins *Patch-Clamp*-Verfahren.

Ich danke dem Team „Hochdurchsatz-Drug- und -Target-Discovery“ vom Fraunhofer ITEM unter der Leitung von Dr. Kamran Honarnejad für die erfolgreiche Zusammenarbeit beim Lokalisations-Assay.

Ich danke Kerstin Robles de Maruri und Silvia Materna-Reichelt für die Unterstützung als technische Assistentinnen.

Meinen lieben Kollegen sage ich Danke für den grandiosen Teamgeist am Institut.

Von Herzen bedanke ich mich bei meinem Mann Stefan für seine bedingungslose moralische Unterstützung und bei meinen Eltern für die Finanzierung meines Studiums.

Diese Arbeit widme ich meiner Großmutter Thekla, die mir die wertvollen Tugenden Fleiß und Strebsamkeit vermittelt hat.