Untersuchungen zur molekularen Pathologie der Bestrophinopathien



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anna-Lena Nachtigal

aus

Ingolstadt

im Jahr

2021

Teile dieser Arbeit sind bereits in einer Peer-Review-Zeitschrift mit freiem Zugang veröffentlicht worden:

Nachtigal, A.-L.; Milenkovic, A.; Brandl, C.; Schulz, H. L.; Duerr, L. M. J.; Lang, G. E.; Reiff, C.; Herrmann, P.; Kellner, U.; Weber, B. H. F. (2020): Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5), S. 1597-1617.

Milenkovic, A.; Brandl, C.; Nachtigal, A.-L.; Kellner, U.; Weber, B. H. F. (2020): Mutationsabhängige Mechanismen und deren Bedeutung für zielgerichtete Behandlungsstrategien am Beispiel von Bestrophin 1 und den Bestrophinopathien. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 237 (3), S. 259-266.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

12.02.2021

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Bernhard H. F. Weber

_____

Anna-Lena Nachtigal

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **1**

Summary **3**

1 Einleitung **5**

1.1 Mutationen im *BEST1* Gen als Ursache der Bestrophinopathien 5

1.1.1 Expression und Funktion von BEST1 5

1.1.2 Struktur des BEST1-Anionenkanals 6

1.2 Die klinischen Krankheitsbilder der Bestrophinopathien 8

1.2.1 Morbus Best (M. Best, *Best disease*, BD) 9

1.2.2 Autosomal Dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) 10

1.2.3 Autosomal Rezessive Bestrophinopathie (ARB) 10

1.3 Modellsysteme zur Erforschung der Bestrophinopathien 11

1.4 Zielsetzung der Arbeit 12

2 Material **14**

2.1 Chemikalien und Reagenzien 14

2.2 Kit- und Reaktionssysteme 15

2.3 Enzyme 16

2.4 Vektoren 16

2.5 Primär- und Sekundärantikörper 17

2.6 Molekularmassenstandards 18

2.7 Oligonukleotide für Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und Sanger-Sequenzierung 18

2.8 Oligonukleotide und Sonden für quantitiative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) 19

2.9 Zelllinien 20

2.9.1 Zellen des retinalen Pigmentepithels abgeleitet aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiRPE-Zelllinien) 20

2.9.2 *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) II-Zelllinien 22

2.9.3 Weitere eukaryotische Zelllinien 23

2.10 Zellkulturmaterialien 23

2.11 Puffer und Lösungen 24

2.12 Geräte 25

2.13 Software 27

3 Methoden **28**

3.1 Generierung und Kultivierung von BEST1-exprimierenden Zellmodellen 28

3.1.1 Humane iRPE-Zellen 28

3.1.1.1 Differenzierung und Kultivierung von hiRPE-Zellen 28
3.1.1.2 Generierung von hiRPE-Zelllinien, die stabil YFP exprimieren 29
3.1.1.2.1 Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung von lentiviralen Partikeln mittels der Kalziumphosphat-Methode 29
3.1.1.2.2 Virale Transduktion mittels Spinfektion 29
3.1.2 MDCKII-Zelllinien, die stabil verschiedene BEST1 Varianten exprimieren 30
3.1.2.1 Transfektion von MDCKII-Zellen mittels Lipofectamine® 3000 30
3.1.2.2 Generierung von MDCKII-Zellen, die mutiertes oder wildtypisches BEST1 sowie YFP koexprimieren 30
3.1.2.3 Generierung von Zelllinien aus Einzelzellen mittels Grenzverdünnungsklonierung 31
3.1.2.4 Kultivierung von MDCKII-Zelllinien 31
3.2 Behandlung von hiRPE- und MDCKII-Zellen für Zellkulturversuche 31
3.3 Immunzytochemie (ICC) 32
3.4 RNA-Isolierung, Reverse Transkriptase (RT), RT-PCR und qRT-PCR 33
3.5 Extraktion genomischer DNA (gDNA), PCR-Amplifikation und Sanger-Sequenzierung 35
3.6 Gewinnung von Proteinproben, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und Western Blot Analyse 36
3.7 Halogenidtransport-Assay 38
3.8 Messung des transepithelischen/transendothelischen elektrischen Widerstands (TEER) 39
3.9 Isolierung und Fütterung von porzinen Photorezeptor-Außensegementen (*photoreceptor outer segements*, POS) 39
3.10 Messung des lysosomalen pH-Wertes in hiRPE-Zellen 40
3.11 Statistische Auswertung und graphische Darstellung 40

4 Ergebnisse 41
4.1 Korrelation zwischen der Lokalisation von *BEST1* Mutationen in der Kanalstruktur und einem Krankheitsbild der Bestrophinopathien 41
4.2 Humane iRPE-Zelllinien als *in vitro* Modell zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien 41
4.2.1 Charakterisierung von M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zelllinien mittels TEERs sowie bezüglich der BEST1 Lokalisation, RNA- und Proteinexpression 42
4.2.2 Einfluss von ADVIRC-assoziierten *BEST1* Mutationen auf das Spleißen der BEST1 mRNA 48
4.2.3 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität in hiRPE-Zellen 49
4.2.4 Analyse der Degradationswege von fehlerhaftem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen 53
4.2.5 Einfluss von M. Best, ADVIRC und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die lysosomale Homöostase in hiRPE-Zellen 56

4.3 MDCKII-Zelllinien als *in vitro* Modell zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien 59
4.3.1 Charakterisierung von M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen bezüglich der BEST1 Lokalisation, RNA- und Proteinexpression 59
4.3.2 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität in MDCKII-Zellen 62
4.3.3 Stabilität von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen 65
4.3.4 Analyse der Degradationswege von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen 67
4.3.5 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die ER-Homöostase in MDCKII-Zellen 70
4.3.6 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die lysosomale Homöostase in MDCKII-Zellen 71
4.3.7 Koexpression von wildtypischem und mutiertem BEST1 in MDCKII-Zellen 72

5 Diskussion 77
5.1 Untersuchungen zur molekularen Pathologie der Bestrophinopathien 77
5.1.1 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die Protein-Lokalisation 78
5.1.2 Degradationsweg von mutiertem BEST1 Protein 79
5.1.3 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelten Membranpermeabilität 83
5.2 Klassifizierung der *BEST1* Mutationen 85
5.3 Therapeutische Behandlungskonzepte in Abhängigkeit der BEST1 Mutationsklasse 88
5.4 Fazit und Ausblick 90

Literaturverzeichnis 92

Abkürzungsverzeichnis 102

Abbildungsverzeichnis 104

Tabellenverzeichnis 106

Danksagung 108

Selbstständigkeitserklärung 109

Zusammenfassung

Das Bestrophin-1 (*BEST1*) Gen kodiert für ein integrales Membranprotein, das beim Menschen im retinalen Pigmentepithel (RPE) exprimiert wird (Marquardt et al., 1998; Stöhr et al., 2002). BEST1 fungiert als Kalzium-aktivierter Chlorid-Kanal, der sich aus fünf identischen BEST1 Untereinheiten bildet (Kane Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014). Zum aktuellen Zeitpunkt sind mehr als 250 unabhängige krankheitsverursachende Mutationen im *BEST1* Gen beschrieben, die mit mehreren distinkten Makulopathien, die unter dem Begriff der Bestrophinopathien zusammengefasst werden, assoziiert sind. Dazu zählen in erster Linie der autosomal dominante Morbus Best (M. Best, *Best Disease*, BD) (OMIM #153700), der auch als Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD) bezeichnet wird (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998), die autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) (OMIM #193220) (Yardley et al., 2004) und die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB) (OMIM #611809) (Burgess et al., 2008). Daneben wurde das autosomal dominante MRCS-Syndrom (Mikrokornea – Zapfen-Stäbchen-Dystrophie – Katarakt – posteriores Staphylom) (OMIM #193220) (Michaelides et al., 2006) sowie die autosomal dominante Retinitis Pigmentosa (RP) (OMIM #613194) (Davidson et al., 2009) mit Mutationen im *BEST1* Gen in Verbindung gebracht.

Die verschiedenen Makulopathien können hinsichtlich ihres Vererbungsmusters, des Erkrankungsalters sowie der Lokalisation und des Ausmaßes der retinalen Läsion unterschieden werden (Kellner et al., 2016). Als gemeinsames Leitsymptom für die klinische Diagnose einer Bestrophinopathie gilt die Reduktion des Lichtanstieges im Elektrookulogramm (EOG) der Patienten (Cross und Bard, 1974). Dieser Anstieg ist ein elektrodiagnostisches Signal, das durch die Chlorid-vermittelte Depolarisation der basolateralen Membran des RPEs erzeugt wird und vermutlich direkt mit der Funktion des BEST1 als Kalzium-aktivierter Chlorid-Kanal in Zusammenhang steht (Sun et al., 2002).

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die molekulare Pathologie bzw. spezifische Mechanismen zu untersuchen, welche zu der Entstehung der unterschiedlichen Krankheitsbilder beitragen. Basierend darauf konnte zusätzlich ein Modell zur Klassifizierung von *BEST1* Mutationen erstellt werden.

Als Modellsystem wurden zum einen RPE-Zellen abgeleitet aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiRPE-Zellen) von Patienten und zum anderen *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) II-Zellen, die unterschiedliche pathogene BEST1 Varianten stabil exprimieren, verwendet. Beide Zellsysteme wurden strukturell und funktionell charakterisiert und als geeignete sowie stabile Modellsysteme zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien identifiziert. Es wurden drei Pathomechanismen betrachtet: (i) die

Lokalisation des BEST1 Proteins in der Zelle, (ii) der Degradationsweg von fehlerhaftem BEST1 Protein und (iii) der Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität. Es ergaben sich fünf BEST1 Mutationsklassen: Klasse I und Klasse II resultieren in homozygoter oder zusammengesetzt-heterozygoter Konstellation in ARB, Klasse III und Klasse IV führen in heterozygoter Konstellation zum autosomal dominanten M. Best und Klasse V zum Krankheitsbild des ADVIRC.

Insbesondere mit den Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zellen war es erstmals möglich ein breites Spektrum an *BEST1* Mutationen in einem physiologischen Modellsystem zu untersuchen und somit fundierte Erkenntnisse über die molekulare Pathologie der Bestrophinopathien zu gewinnen. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Auswahl einer zielgerichteten und sinnvollen Therapie, die für den Patienten die größtmögliche Verbesserung der Symptomatik und letztendlich der Lebensqualität bedeutet.

Summary

Human Bestrophin 1 (*BEST1*) encodes an integral membrane protein expressed exclusively in the retinal pigment epithelium (RPE) (Marquardt et al., 1998; Stöhr et al., 2002). Functional BEST1 is a calcium-regulated chloride channel, composed of five identical BEST1 subunits building a homopentamer (Kane Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014). Until now, over 250 pathogenic mutations in the *BEST1* gene have been associated with the so called bestrophinopathies, including autosomal dominant Best disease (BD) (OMIM #153700), also called Best vitelliform macular dystrophy (BVMD) (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998), autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC) (OMIM #193220) (Yardley et al., 2004) as well as autosomal recessive bestrophinopathy (ARB) (OMIM #611809) (Burgess et al., 2008). Additionally, autosomal dominant MRCS syndrome (microcornea – cone-rod dystrophy – cataract – posterior staphyloma) (OMIM #193220) (Michaelides et al., 2006) and autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP) (OMIM #613194) (Davidson et al., 2009) have been associated with mutations in the *BEST1* gene.

The different bestrophinopathies can be distinguished by the mode of inheritance, age of onset, as well as the location and extent of the retinal lesion (Kellner et al., 2016), but they all share a common feature which is the obvious reduction of the light increase in the electrooculogram (EOG) of patients (Cross und Bard, 1974). This increase is an electrodiagnostic signal generated by the chloride-mediated depolarization of the basolateral membrane of the RPE and is thought to be directly associated with the function of BEST1 as a calcium-regulated chloride channel (Sun et al., 2002).

The main aim of this work was to elucidate the molecular pathology or specific mechanisms that contribute to the development of the different disease patterns. Based on this, a model for the classification of *BEST1* mutations could be created.

As a model system RPE cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiRPE cells) of patients and Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) II cells expressing different pathogenic BEST1 variants were used. Both cell systems were structurally and functionally characterized and identified as suitable as well as stable model systems to study the molecular pathology of the bestrophinopathies. Three pathomechanisms were considered: (i) the localization of the BEST1 protein in the cell, (ii) the degradation pathway of mutant BEST1 protein, and (iii) the influence of *BEST1* mutations on the BEST1-mediated membrane permeability. Five BEST1 mutation classes were defined: homozygous or compound heterozygous mutations of class I and class II result in ARB, whereas heterozygous mutations of class III and class IV result in autosomal dominant BD and class V in ADVIRC.

In particular, by using patient-derived hiRPE cells, it was for the first time possible to investigate a broad spectrum of *BEST1* mutations in a physiological model system and thus gain insights into the molecular pathology of the bestrophinopathies. This plays an important role in the selection of an appropriate and meaningful therapy, which brings the greatest possible improvement in symptoms and ultimately in quality of life for the patient.

1 Einleitung

1.1 Mutationen im *BEST1* Gen als Ursache der Bestrophinopathien

Die Bestrophine sind eine Gruppe von vier hoch konservierten Genen (*BEST1 - 4*), die alle für Ionenkanäle kodieren (Hartzell et al., 2008; Milenkovic et al., 2008). Mutationen in *BEST1* sind ursächlich für mehrere distinkte Makulopathien, die unter dem Begriff der Bestrophinopathien zusammengefasst werden. Dagegen konnte bisher keines der Homologe *BEST2 - 4* mit einer Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Lediglich für *BEST2* wird eine noch nicht erkannte Rolle in der Gesundheit des Menschen vermutet, da gezeigt werden konnte, dass *BEST2 knock-out* Mäuse einen reduzierten Augeninnendruck besitzen (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2010) sowie eine völlige Unfähigkeit zum Schwitzen (Cui et al., 2012).

Das integrale Membranprotein BEST1 besteht aus 585 Aminosäuren, wovon die ersten ~ 350 Aminosäuren zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert sind (Milenkovic et al., 2018). 1998 wurden die Bestrophine erstmals im menschlichen Genom aufgrund der Assoziation von *BEST1* Mutationen mit M. Best identifiziert (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998). Mittlerweile sind mehr als 250 krankheitsverursachende Mutationen im *BEST1* Gen in der *Human Gene Mutation Database* (aufgerufen Oktober 2020) aufgelistet, bei welchen es sich überwiegend um Missense-Mutationen, aber auch um In-frame-Deletionen sowie -Insertionen, Nonsense- und Framshift-Mutationen handelt.

1.1.1 Expression und Funktion von BEST1

Northern Blot Untersuchungen deckten auf, dass *BEST1* am stärksten beim Menschen in der Retina, gefolgt von Gehirn und Rückenmark, exprimiert wird (Petrukhin et al., 1998). In-situ-Hybridisierungen identifizierten das RPE als einzige BEST1-exprimierende Zellschicht im adulten humanen Auge (Marquardt et al., 1998). Darauffolgend konnte gezeigt werden, dass das BEST1 Protein ausschließlich an der basolateralen Membran von Zellen des RPEs lokalisiert ist (Marmorstein et al., 2000). Diese RPE-spezifische Expression und/oder die Lokalisation an der basolateralen Membran von BEST1 wurde in unabhängigen Studien bestätigt, die endogen exprimiertes Protein in fetalem humanem RPE (fhRPE), RPE-Zellen abgeleitet aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiRPE-Zellen), Hunden, Rhesusaffen und adulten humanen *post mortem* Augen untersuchten (Marmorstein et al., 2004; Marmorstein et al., 2006; Mullins et al., 2007; Gouras et al., 2009; Zhang et al., 2010; Guziewicz et al., 2013; Johnson et al., 2013; Singh et al., 2013b; Brandl et al., 2014; Johnson et al., 2015; Marmorstein et al., 2015; Milenkovic et al., 2015).

Sun et al. (2002) zeigten, dass die heterologe Überexpression von BEST1 in HEK293-Zellen Chlorid-Ströme induziert, und lieferten somit erste Hinweise, dass BEST1 als Anionenkanal fungiert. Es folgten weitere Studien sowohl im heterologen Expressionssystem (Hartzell et al., 2008; Xiao et al., 2010) als auch Untersuchungen mit Zellen des RPEs, die endogen BEST1 exprimieren (Marmorstein et al., 2015; Milenkovic et al., 2015; Moshfegh et al., 2016). Beispielsweise wurde mittels adenoviraler Transduktion in fhRPE-Zellen die pathogene BEST1 Variante W93C überexprimiert, welche in der Pore des BEST1-Ionenkanals liegt und vermutlich die Funktion des Proteins beeinflusst. Im Vergleich zu untransfizierten fhRPE-Zellen, die endogen normales BEST1 exprimieren, wiesen die manipulierten Zellen eine deutliche Reduktion im transepithelialen Potential auf (Marmorstein et al., 2015). Darüber hinaus demonstrierten *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration, dass hiRPE-Zellen von gesunden Spendern einen Volumen-abhängigen Chlorid-Strom zeigen, welcher in hiRPE-Zellen von Patienten stark reduziert ist (Milenkovic et al., 2015). Letztlich verwendeten Moshfegh et al. (2016) einen Anionen-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff, um zu demonstrieren, dass die Kalzium-stimulierte Chlorid-Sekretion in hiRPE-Zellen von Patienten im Vergleich zu Kontroll-Zellen geringer ist. Daneben wird BEST1 eine Beteiligung an der Kalziumhomöostase (Singh et al., 2013a; Marmorstein et al., 2015), der Regulation des Zellvolumens (Milenkovic et al., 2015) sowie eine Rolle im transepithelialen Potential des RPEs zugeschrieben (Marmorstein et al., 2015).

1.1.2 Struktur des BEST1-Anionenkanals

2014 wurden röntgenkristallographische Analysen des BEST1-Ionenkanals des Huhns (cBest1) (Kane Dickson et al., 2014) sowie des Bakteriums *Klebsiella pneumoniae* (kpBest1) (Yang et al., 2014) durchgeführt. Die Proteine aus den beiden Spezies weisen eine Homologie der ersten ~ 350 Aminosäuren von ~ 74 % für cBest1 bzw. ~ 14 % für kpBest1 im Vergleich zu humanem Protein auf (Kane Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014; Vaisey et al., 2016). Bisher ist es noch nicht gelungen, die Röntgenkristallstruktur des humanen Proteins zu entschlüsseln. Jedoch ist es aufgrund der großen Homologie möglich, die Ergebnisse von cBest1 und kpBest1 auf humanes BEST1 zu übertragen

Der Ionenkanal bildet sich aus fünf identischen BEST1-Monomeren, die sich symmetrisch um eine zentrale Achse anordnen und somit eine trichterförmige Pore bilden. Jedes Monomer besitzt vier Transmembrandomänen (TMD1 - TMD4), wobei die N- und C-Termini jeweils auf der zytoplasmatischen Seite liegen. TMD1 und TMD2 sowie TMD3 und TMD4 sind extrazellulär über kurze hydrophobe Aminosäuresequenzen miteinander verbunden, während

TMD2 und TMD3 intrazellulär über eine große Schleife verknüpft sind (Kane Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014).

Es wurden Regionen im Kanal identifiziert, die für dessen Funktion eine wichtige Rolle spielen. Die Verengung in der „Hals-Region“ (*neck*; cBest1: I76, F80 und F84) sowie die Verengung am Ende der Pore, die als „Apertur“ bezeichnet wird (*aperture*; cBest1: V205), sind für die Ionenpermeabilität und –selektivität verantwortlich. Nahe der „Hals-Region“ befinden sich „Kalzium-Bindestellen“ (*Ca^{2+} clasps*) (Kane Dickson et al., 2014) (**Abbildung 1A**). Das Binden von Kalzium bewirkt Konformationsänderungen, die das Öffnen des Kanals induzieren. Bei diesem Vorgang klappen die hydrophoben Aminosäuren der „Hals-Region“ (cBest1: I76, F80 und F84) nach außen. Aminosäuren, die auf den naheliegenden Helices lokalisiert sind (cBest1: S79, G83, Y236, F282, F283 und W287), ordnen sich neu an. Somit weitet sich die Pore und Ionen können den Kanal passieren. Die „Apertur“ und der zytoplasmatische Teil des Proteins bleiben dabei unverändert (Miller et al., 2019) (**Abbildung 1B** und **Abbildung 1C**).

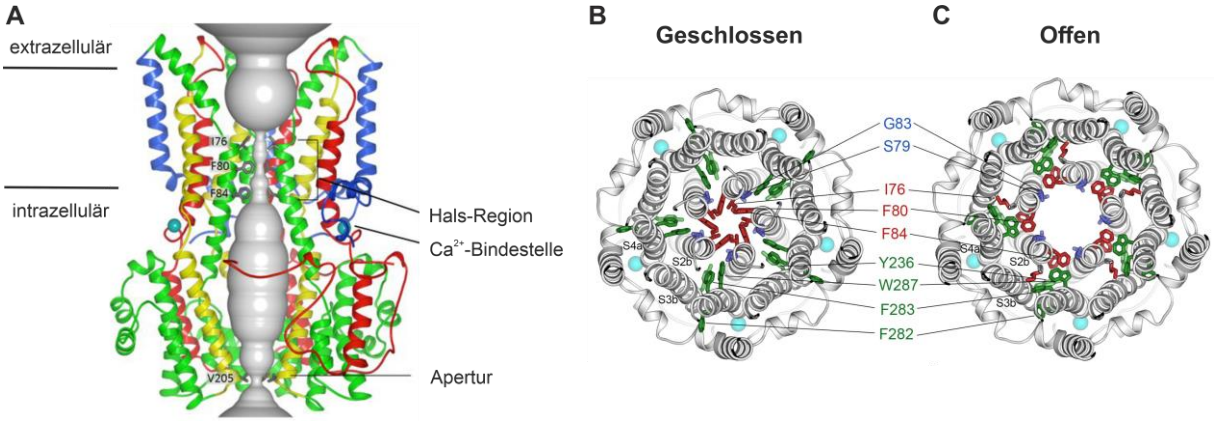


Abbildung 1: Struktur des BEST1-Anionenkanals. (A) Röntgenkristallstruktur des normalem BEST1-Anionenkanals des Huhns (cBest1). Zur besseren Übersicht sind drei BEST1-Monomere abgebildet, die zwei im Vordergrund wurden entfernt. Die Ionenpore (grau) ist als Darstellung des minimalen radialen Abstandes von der Mittelachse zum nächsten Van-der-Waals-Proteinkontakt zu sehen. Die Sekundärstruktur ist farblich nach den vier Abschnitten markiert (S1: blau; S2: grün; S3: gelb und S4 sowie C-Terminus: rot). Die Transmembrandomäne befindet sich zwischen dem extra- und intrazellulären Bereich des Kanals. Die „Hals-Region“ wird von den Aminosäuren I76, F80 und F84 gebildet; die „Apertur“ von der Aminosäure V205. Kalzium-Ionen (blau) binden an der Kalzium-Bindestelle. Schleusenmechanismus des BEST1-Kanals. **(B)** Geschlossene und **(C)** offene Konformation der „Hals-Region“, betrachtet von der extrazellulären Seite. Die hydrophoben Aminosäuren sind rot markiert (I76, F80 und F84). Umliegende aromatische Reste, die sich neu anordnen sind grün (Y236, F282, F283 und W287) bzw. blau (S79 und G83) dargestellt. Hellblaue Kugeln kennzeichnen Kalzium-Ionen. Abbildung modifiziert nach Vaisey et al. (2016), (A), sowie Miller et al. (2019), (B-C).

Durch die Aufklärung der BEST1-Kanalstruktur kann der dominant-negative-Effekt erklärt werden. Dieser beschreibt den Sachverhalt, dass der Einbau einer fehlerhaften Protein-Untereinheit in einen Multimer-Komplex dessen Gesamtfunktion stärker beeinträchtigt als das vollständige Fehlen des entsprechenden Proteins (Schaaf und Zschocke, 2013). Unter der Annahme, dass sich fehlerhafte und normale BEST1-Monomere mit derselben Wahrscheinlichkeit in den aus fünf gleichen Untereinheiten bestehenden BEST1-Kanal

einbauen, genügt schon das Vorhandensein von einem fehlerhaften BEST1-Monomer, um die Funktionsfähigkeit des gesamten Kanals zu beeinträchtigen (Milenkovic et al., 2020). Der dominant-negative-Effekt wurde in funktionellen Studien beobachtet, welche die Lokalisation sowie die Chlorid-Leitfähigkeit in einem Überexpressionssystem, das normales und fehlerhaftes BEST1 exprimiert, untersuchten (Yu et al., 2006; Davidson et al., 2011; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2013).

1.2 Die klinischen Krankheitsbilder der Bestrophinopathien

Unter den Bestrophinopathien wird eine Gruppe von Makulopathien zusammengefasst, die ihren Ursprung in Mutationen des *BEST1* Gens haben (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998). Dazu zählen in erster Linie der autosomal dominante Morbus Best (M. Best, *Best Disease*, BD) (OMIM #153700), der auch als Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD) bezeichnet wird (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998), die autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) (OMIM #193220) (Yardley et al., 2004) und die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB) (OMIM #611809) (Burgess et al., 2008). Daneben wurde das autosomal dominante MRCS-Syndrom (Mikrokornea – Zapfen-Stäbchen-Dystrophie – Katarakt – posteriores Staphylom) (OMIM #193220) (Michaelides et al., 2006) sowie die autosomal dominante Retinitis Pigmentosa (RP) (OMIM #613194) (Davidson et al., 2009) mit Mutationen im *BEST1* Gen in Verbindung gebracht.

Als gemeinsames Leitsymptom für die klinische Diagnose der Bestrophinopathien gilt die Reduktion des Lichtanstieges im EOG der Patienten (Cross und Bard, 1974). Dieser Anstieg ist ein elektrodiagnostisches Signal, das durch die Chlorid-vermittelte Depolarisation der basolateralen Membran des RPEs erzeugt wird und vermutlich direkt mit der Funktion des BEST1 als Kalzium-aktivierter Chlorid-Kanal in Zusammenhang steht (Sun et al., 2002). Zur weiteren Diagnose eines Krankheitsbildes der Bestrophinopathien kommen neben elektrophysiologischen Untersuchungen auch nicht-invasive retinale Bildgebungsverfahren wie Farb-Fundusaufnahmen (*color fundus images*, CFP), Spektral-Domänen optische Kohärenztomographie (*spectral domain-optical coherence tomography*, SD-OCT), Fundusautofluoreszenz (*fundus autofluorescence*, FAF) und Nah-Infrarot-Autofluoreszenz (*near infrared autofluorescence*, NIA) zum Einsatz. Darüber hinaus spielt die Familienanamnese und letztendlich die genetische Diagnostik eine große Rolle (Kellner et al., 2016). Bis heute steht jedoch für keine der Bestrophinopathien eine geeignete Therapie zur Verfügung.

1.2.1 Morbus Best (M. Best, *Best disease*, BD)

Der M. Best ist die häufigste Form der Bestrophinopathien mit Prävalenzangaben von 1:5.000 in Schweden (Nordström, 1974), 1:67.000 in Dänemark (Bitner et al., 2012) und 1:16.500 bis 1:21.000 in Minnesota, USA (Dalvin et al., 2017). Erstmals wurde die Krankheit 1905 von dem deutschen Ophthalmologen Friedrich Best beschrieben, der acht Patienten aus einer Familie untersucht hatte (Best, 1905).

M. Best ist eine progressive Erkrankung mit Beginn zwischen der ersten und sechsten Lebensdekade (Mohler und Fine, 1981; Renner et al., 2005), jedoch ist das Erkrankungsalter sowie die Expressivität sehr variabel (Boon et al., 2009; Marmorstein et al., 2009). Phänotypische Auffälligkeiten finden sich überwiegend im posterioren Augenpol (Boon et al., 2009) und können in fünf Stadien eingeteilt werden. Stadium 1 (prävitelliformes Stadium) zeichnet sich durch ein abnormales EOG aus, das für den gesamten Krankheitsverlauf charakteristisch ist. Dagegen ist sowohl der Fundus als auch der Visus unauffällig (Mohler und Fine, 1981; Marmorstein et al., 2009). Sobald die klassische eidotterförmige gut abgegrenzte Läsion (*egg yolk*) mittig der Makula sichtbar wird, ist Stadium 2 (vitelliformes Stadium) erreicht (**Abbildung 2A**). Die gelbliche Erscheinung wird subretinal und durch im RPE akkumuliertes Lipofuszin hervorgerufen. Der Visus ist meist noch unbeeinträchtigt bzw. nur leicht vermindert (Marmorstein et al., 2009). In Stadium 3 (pseudohypopyones Stadium) kann teilweise Flüssigkeit austreten und es können kleine weißliche Knötchen am Pupillenrand sichtbar werden (Marmorstein et al., 2009). Stadium 4 (vitelliruptives Stadium, „Rührei“-Stadium) ist durch die Ruptur und die Verteilung der Lipofuszinansammlung sowie durch einen deutlich abfallenden Visus gekennzeichnet. Letztlich atrophiert in Stadium 5 (fibrotisches Stadium) der RPE-Photorezeptor-Komplex (Marmorstein et al., 2009). Typischerweise tritt M. Best bilateral und symmetrisch auf. Es sind jedoch auch Patienten mit einem unilateralen Phänotyp (Arora et al., 2016; Kaden et al., 2017) oder mit multifokalen vitelliformen Läsionen (Ciulla und Frederick, 1997; Lacassagne et al., 2011) beschrieben worden. Darüber hinaus gibt es Patienten, bei welchen ein normales EOG vorliegt (Pollack et al., 2005; Khan et al., 2018a). Ein besonderer Phänotyp wird durch die *BEST1* Mutation p.(A243V) verursacht. Bei dieser sogenannten Musterdystrophie sind anstelle einer vitelliformen Läsion musterartige Pigmentveränderungen erkennbar. Der Verlauf ist meist milder und geht mit einem begrenzten Visusverlust einher (Boon et al., 2009; Khan et al., 2018b).

1.2.2 Autosomal Dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC)

Die zweite autosomal dominant vererbte Bestrophinopathie ist die selten auftretende ADVIRC. Erstmals wurde sie 1982 von Kaufman et al. bei einem 12 Jahre alten Jungen beschrieben. Zum jetzigen Zeitpunkt sind lediglich fünf *BEST1* Mutationen bekannt, die zu diesem Krankheitsbild führen: p.(G83D) (Chen et al., 2016), p.(V86M) (Yardley et al., 2004), p.(V235A) (Burgess et al., 2008), p.(Y236C) (Yardley et al., 2004) und p.(V239M) (Yardley et al., 2004).

Im Gegensatz zu M. Best ist in ADVIRC nicht der posteriore Augenpol betroffen, sondern die Peripherie (Kaufman et al., 1982). Charakteristisch ist hierbei eine chorioretinale Atrophie mit einer scharfen hyperpigmentierten Demarkationslinie, die sich vom Äquator bis zur Ora serrata erstreckt (**Abbildung 2B**). Häufig verläuft die Retinopathie langsam progredient und der Visus bleibt erhalten. Begleitend wurden okuläre Entwicklungsanomalien, sowie Nachtblindheit, Gesichtsfeldeinengung und Septo-optische Dysplasie beschrieben (Yardley et al., 2004; Kellner et al., 2012).

1.2.3 Autosomal Rezessive Bestrophinopathie (ARB)

Die ARB wurde erstmals von Burgess et al. (2008) beschrieben. Patienten stellen sich meist aufgrund des verminderten Visus vor, der in der ersten bis zweiten Lebensdekade auftritt (Boon et al., 2009; Marmorstein et al., 2009). Bezeichnend für die Ausprägung dieser Form der Bestrophinopathie sind kleine Läsionen und multiple gelbliche Ablagerungen, die sich über den posterioren Augenpol und die gesamte periphere Netzhaut verteilen (**Abbildung 2C**) sowie ein großes autofluoreszierendes Areal (Burgess et al., 2008; Boon et al., 2009; Marmorstein et al., 2009). Der Visus der Patienten verschlechtert sich zunehmend, jedoch mit einem vergleichbar langsamen Verlauf. Begleitend können okuläre Anomalien wie Hyperopie, Amblyopie oder Winkelblockglaukom auftreten (Burgess et al., 2008; Boon et al., 2009). Die Erkrankung tritt meist in zusammengesetzt-heterozygoter (Burgess et al., 2008) oder in seltenen Fällen in homozygoter (Wong et al., 2010; Bitner et al., 2012) Konstellation auf. Die heterozygoten Elternteile der Patienten sind in der Regel symptomfrei und funduskopisch unauffällig (Burgess et al., 2008).

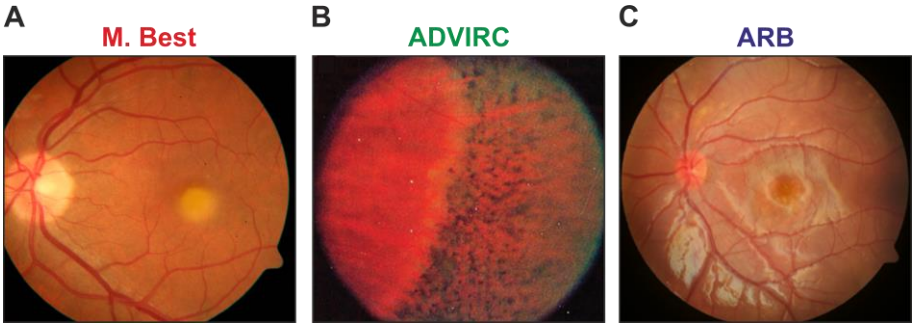


Abbildung 2: Farb-Fundusaufnahmen von M. Best, ADVIRC und ARB Patienten. (A) Charakteristische Fundusaufnahme eines M. Best Patienten (heterozygot für die Mutation p.(N11K)) mit einer gelblich, gut abgegrenzte Lipofuszinablagerung in Form eines Eidotters (*egg yolk*) mittig der Makula. **(B)** In der Fundusaufnahme eines ADVIRC Patienten (heterozygot für die Mutation p.(V86M)) ist die scharf abgegrenzte hyperpigmentierte Demarkationslinie, die die Grenze zwischen unbeeinträchtigter und degenerierter Retina bildet, sichtbar. **(C)** Fundusaufnahme eines ARB Patienten (zusammengesetzt-heterozygot für die Mutationen p.(N99K) und p.(R141H)) mit kleinen Läsionen und multiplen gelblichen Ablagerungen entlang der oberen und unteren Gefäßarkaden. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020), (A) und (C), sowie Kellner et al. (2016), (B).

1.3 Modellsysteme zur Erforschung der Bestrophinopathien

Zur Erforschung der Bestrophinopathien und der zugrundeliegenden Pathomechanismen stehen eine Reihe von Modellorganismen zur Verfügung. Im Bereich der *in vivo* Tiermodelle existieren zwei Best1 *knock-out* Mauslinien (Marmorstein et al., 2006; Milenkovic et al., 2015), die jedoch beide keinen, den Bestrophinopathien entsprechenden, Phänotyp zeigen. Dagegen wiesen die nachfolgend generierten *knock-in* Mäuse mit der Best1 Mutation W93C eine dominante Vererbung sowie eine unvollständige Penetranz auf, vergleichbar mit dem Phänotyp des M. Best (Zhang et al., 2010). Anhand der *knock-in* Mauslinie Best1$^{+/Y227N}$ konnte demonstriert werden, dass die Spermienmotalität sowie die Befruchtungsfähigkeit deutlich reduziert ist (Milenkovic et al., 2019). Begründet kann diese Beobachtung dadurch werden, dass in der Maus BEST1 vorwiegend im Testisgewebe und nur in sehr geringem Maße in der Retina exprimiert wird (Milenkovic et al., 2015; Milenkovic et al., 2019). Neben den gezielt erzeugten Mausmodellen gibt es ein natürlich vorkommendes Hundemodell, das einige Aspekte der humanen ARB in Bezug auf Beteiligung der Makula, Erkrankungsalter, Verlauf und molekulare Konsequenzen der *BEST1* Mutationen abbildet (*canine bestrophinopathy*) (Guziewicz et al., 2011; Guziewicz et al., 2012). Das Hundemodell ist aufgrund des autosomal rezessiven Erbgangs besonders attraktiv zur Erforschung einer Genersatztherapie (Guziewicz et al., 2013).

Als *in vitro* Modellsystem stehen zum einen immortalisierte Zelllinien, die aus dem RPE des Menschen (ARPE-19 und D407) oder der Ratte (RPE-J) stammen, zur Verfügung. Diese exprimieren zwar BEST1 mRNA, jedoch kann kein BEST1 Protein detektiert werden (Marmorstein et al., 2000). Zum anderen sind Epithelzelllinien der Niere aus dem Menschen (HEK293, *human embryonic kidney*) oder aus dem Hund (MDCKII) beliebte Modellsysteme.

Insbesondere die Fähigkeit zur Polarisierbarkeit macht MDCKII-Zellen zu einem geeigneten Überexpressionssystem für Untersuchungen zur Lokalisation sowie zum Transport von Proteinen (Milenkovic et al., 2018).

Alternativ können primäre humane RPE-Zellen zu Studien herangezogen werden. Allerdings steht dieses Zellsystem nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung, da es auf Spender angewiesen ist. Darüber hinaus sind primäre humane RPE-Zellen in Kultur aufgrund des Verlusts ihrer Teilungsfähigkeit nur für eine limitierte Dauer nutzbar (Grisanti und Guidry, 1995). Auch die Verwendung von RPE-Zellen, welche aus embryonalen Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC) differenziert werden, besitzen den Nachteil der begrenzten Verfügbarkeit und ihr Gebrauch ist aus ethischen Gründen umstritten (Wiedemann et al., 2004). Dagegen bilden RPE-Zellen differenziert aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (*human induced pluripotent stem cells*, hiPSCs) ein leicht zugängliches Modellsystem, da für dessen Generierung adulte somatische Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood monoculear cells*, PBMCs), herangezogen werden können. Darüber hinaus sind hiRPE-Zellen den nativen RPE-Zellen morphologisch und funktionell sehr ähnlich. So besitzen die Zellen eine hexagonale Form, sind pigmentiert, bilden Schlussleisten (*tight junctions*) und können Photorezeptor-Außensegmente (*photoreceptor outer segments*, POS) (Brandl et al., 2014) sowie Retinoide (Fields et al., 2015) prozessieren.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Eine Besonderheit der Bestrophinopathien besteht darin, dass Mutationen in demselben Gen, *BEST1*, zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. Das Ziel dieser Arbeit liegt darin, die molekulare Pathologie bzw. spezifische Mechanismen zu untersuchen, welche zu der Entstehung der unterschiedlichen Krankheitsbilder beitragen.

Hinweise auf solche potentiellen Mechanismen lieferten Experimente, die zeigten, dass Mutationen die Lokalisation des BEST1 Proteins (Davidson et al., 2009; Davidson et al., 2011; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2013; Johnson et al., 2014; Milenkovic et al., 2015), die Proteinstabilität (Uggenti et al., 2016; Milenkovic et al., 2018), den Degradationsweg von fehlerhaftem Protein (Uggenti et al., 2016; Milenkovic et al., 2018), den POS-Abbau (Singh et al., 2013b) sowie die Funktion als Chloridkanal beeinflussen (Xiao et al., 2010; Milenkovic et al., 2015; Moshfegh et al., 2016; Li et al., 2017; Ji et al., 2019a).

Anknüpfend an die früheren Studien sollten in dieser Arbeit der Einfluss von unterschiedlichen *BEST1* Mutationen insbesondere auf die Proteinlokalisation, auf den Proteindegradationsweg, auf die lysosomale und proteasomale Homöostase sowie auf die Kanalfunktion untersucht

werden. Als Modellsystem kamen zum einen insgesamt 16 hiRPE-Zelllinien von Patienten mit M. Best, ADVIRC bzw. ARB sowie von gesunden Spendern zum Einsatz. Zum anderen wurden MDCKII-Zellen, die verschiedene pathogene BEST1 Varianten stabil exprimieren, als ein *in vitro* Überexpressionssystem verwendet. Letztendlich konnte auf Basis der untersuchten molekularen Pathomechanismen ein Modell zur Klassifizierung von *BEST1* Mutationen erstellt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und deren Hersteller

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroquin Phosphat (CQ)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Dimethylformamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Essigsäure 100%	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ≥99,8 p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37 %	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Galactose	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd 25 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol 87%	Chemikalienausgabe, Universität Regensburg, Deutschland
Glycin	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
HiDi™ Formamid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mannose	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland

Methanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Monensin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat Trihydrat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat ≥99% (SDS)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumiodid	Biomol, Hamburg, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Paraformyaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 40% Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 1M	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure rauchend 37%	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ß-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.2 Kit- und Reaktionssysteme

Tabelle 2: Verwendete Kit- und Reaktionssysteme und deren Hersteller

Kit- bzw. Reaktionssystem	Hersteller
BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
GoTaq® Long Expand PCR Master Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Lipofectamine® 3000 Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NucleoBond® XtraMidi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
pGEM®-T Vector System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
PureLink® RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

RNeasy Micro Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
T4 DNA Ligase Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.3 Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Enzyme und deren Hersteller

Enzyme	Hersteller
Exonuklease I (Exo)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
House-Taq DNA Polymerase	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
Pfu DNA Polymerase	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PfuUltra II Fusion HotStart DNA Polymerase	Agilent Technologies, Santa Klara, CA, USA
RevertAid™ Reverse Transkriptase	(Fermentas) Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase-free DNase I	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.4 Vektoren

Tabelle 4: Verwendete Vektoren und deren Herkunft

Vektorbezeichnung	Herkunft
hBest1-A195V-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-A243V-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-R141H-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-V235A-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-V235M-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-V239M-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-V86M-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-WT-1D4-pLJM1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-WT-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
hBest1-Y236C-pCDNA3.1	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
pcDNA3.1	Themo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pcDNA3.1-EYFP-H148Q/I152L	Luis J. V. Galietta, #25872, Addgene, MA, USA
pGEM®-T	Promega Corporation, Madison, WI, USA

pLJM1-EYFP-H148Q/I152L	Institut für Humangenetik, Regensburg, Deutschland
pMD2.G	Didier Trono, #12259, Addgene, MA, USA
psPAX2	Didier Trono, #12260, Addgene, MA, USA

2.5 Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Typ	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
ACTB	mAK	Maus	1:10.000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BEST1 (334)	pAK	Kaninchen	1:250 1:2500	ICC WB	Im Auftrag vom Institut für Humangenetik, Regensburg, produziert von Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland
CTNNB1	mAK	Maus	1:1000	ICC / WB	BDBioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Rho-1D4	mAK	Maus	1:1000	ICC / WB	Prof. Dr. Robert S. Molday, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Kanada

pAK: polyklonaler Antikörper; mAK: monoklonaler Antikörper; WB: Western Blot; ICC: Immunzytochemie

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 conjugated	1:10.000	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Goat anti-Rat IgG, Alexa Fluor® 594 conjugated	1:10.000	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IRDye® 680CW Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	1:10.000	WB	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:10.000	WB	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA

WB: Western Blot; ICC: Immunzytochemie

2.6 Molekularmassenstandards

Tabelle 7: Verwendete Molekularmassenstandards und deren Hersteller

Standard	Verwendungszweck	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.7 Oligonukleotide für Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und Sanger-Sequenzierung

Tabelle 8: Name, Sequenz und Verwendungszweck der Oligonukleotide für die PCR und Sanger-Seqenzierung

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
dogBest1-R	CAGACCTGTTTTCCAAGGCC	Amplifikation BEST1 gDNA Exon 10 (hiRPE); Sequenzierung von rs1800009 in gDNA (hiRPE)
dogXBP1-R	GGATCCAAGTTGAACAGAATGC	XBP1 in RT-PCR (MDCKII)
GAPDH-F	ATCGTGGAAGGACTCATGACC	GAPDH in RT-PCR (MDCKII)
GAPDH-R	AGCGCCAGTAGAGGCAGGGAT	GAPDH in RT-PCR (MDCKII)
hBest1_F_NheI	GCTAGCACCATGACCATCACTTACACAAG	Amplifikation BEST1 cDNA voller Länge (hiRPE); Sequenzierung BEST1 cDNA volle Länge (hiRPE)
hBest1_R_MluI	ACGCGTTTAGGAATGTGCTTCATCCC	Amplifikation BEST1 cDNA voller Länge (hiRPE)
huXBP1-F	TTACGAGAGAAAACTCATGGCC	XBP1 in RT-PCR (MDCKII)
hVMD2-RT-R	GACTGGATCAGTGTCCTGCTG	Amplifikation BEST1 cDNA Exon 10 (hiRPE)
mVMD2_F3	AGCTACATCCAGCTCATCCC	Sequenzierung BEST1 cDNA volle Länge (hiRPE)
N11K-BamHI-R	GGATCCGTGGGGCCAGACAAAGCC	Amplifikation BEST1 gDNA Exon 2 (hiRPE)
N11K-EcoRI-F	GAATTCATCCCTACAAACCCCCAATC	Amplifikation BEST1 gDNA Exon 2 (hiRPE); Sequenzierung von rs1800007 in gDNA (hiRPE)
Tu_15_NEW_R1	GGTAGGCTCAGTTTCTCCAA	BEST1 in RT-PCR (MDCKII); Amplifikation BEST1 cDNA Exon 4 (MDCKII); Sequenzierung BEST1 cDNA Exon 4 (MDCKII)

Tu15_NEW_F2	CAGTACGAGAACCTGCCGTG	BEST1 in RT-PCR (MDCKII); Amplifikation BEST1 cDNA Exon 6 und 7 (MDCKII)
Tu15_NEW_F4	CATGACCATCACTTACACAAGC	Amplifikation BEST1 cDNA Exon 2 (hiRPE); Sequenzierung von rs1800007 in cDNA (hiRPE); Amplifikation BEST1 cDNA Exon 4 (MDCKII)
Tu15_NEW_R2	ATCTCATCCACAGCCAACAG	Amplifikation BEST1 cDNA Exon 6 und 7 (MDCKII); Sequenzierung BEST1 cDNA Exon 6 und 7 (MDCKII)
Tu15_Race_1H	CTTGTAGACTGCGGTGCTGACG	Amplifikation BEST1 cDNA Exon 2 (hiRPE)
Tu15_Race_2	CCACGGCAGGTTCTCGTACT	Sequenzierung BEST1 cDNA volle Länge (hiRPE)
TU15newF6	GAAGCTTAAGGCTGTGGACG	Amplifikation BEST1 gDNA Exon 10 (hiRPE); Amplifikation BEST1 cDNA Exon 10 (hiRPE); Sequenzierung von rs1800009 in cDNA (hiRPE)

Alle verwendeten Primer wurden von Metabion, Planegg, Deutschland erworben.

2.8 Oligonukleotide und Sonden für quantitiative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Tabelle 9: Name, Sequenz und Sonde der Oligonukleotide für die qRT-PCR

Name	Sequenz (5'→3')	Gen	Sonde #
hBEST-iso-N-term-F	AGCTGCTATATGGCGAGTTCTT	*BEST1*	4
hBEST-iso-N-term-R	GTGAGGGCCAGCCTATAAATAA	*BEST1*	4
hHPRT2-qRT-F	TGATAGTCCATTCCTATGACTGTAGA	*HPRT1*	73
hHPRT2-qRT-R	AAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG	*HPRT1*	73
hRPE65_RT_F	GCCTTGGAAGAAGATGATGG	*RPE65*	68
hRPE65_RT_R	TGGCATTCAGAATCAGGAGA	*RPE65*	68

Alle Oligonukleotide wurden von Metabion, Planegg, Deutschland und alle Sonden von Roche, Basel, Schweiz erworben.

2.9 Zelllinien

2.9.1 Zellen des retinalen Pigmentepithels abgeleitet aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiRPE-Zelllinien)

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zelllinien

Aminosäuren-Austausch	Nukleotid-Austausch	Pseudonym (Klonnummer)	Geschlecht	Klinischer Befund
+/+ #1	-	MK (#22, #27b)	m	gesund
+/+ #2	-	AM (#13, #260)	w	gesund
+/+ #3	-	NG (#1)	w	gesund
+/N11K	33T>G	MW (#232)	m	M. Best
+/R218C	652C>T	MO (#214)	m	M. Best
+/A243V	728C>T	SK (#16)	m	M. Best
+/Q238R	713A>G	DL (#Pka, #Pkb)	m	M. Best
+/I295del #1	884_886delTCA	AP (#187)	m	M. Best
+/I295del #2	884_886delTCA	MD (#18)	m	M. Best
N99K/R141H	422G>A/297C>A	LA (#29, #33)	w	ARB
+/N99K	422G>A	EA (-)	w	ARB Eltern (gesund)
+/R141H	297C>A	MA (#74, #77)	m	ARB Eltern (gesund)
A195V/L197PX26	584C>T/590_615del26	TT (#178, #180)	m	ARB
+/A195V	584C>T	PT (#172, #176)	m	ARB Eltern (gesund)
+/L197PX26	590_615del26	AT (#166, #168)	w	ARB Eltern (gesund)
+/V86M #1	256G>A	IS (#53a, #53b)	w	ADVIRC
+/V86M #2	256G>A	JS (#52a, #52b)	m	ADVIRC

M. Best: Morbus Best; ARB: autosomal rezessive Bestrophinopathie; ADVIRC: autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie

Eine detaillierte klinische Beschreibung der Patienten ist in Milenkovic et al. (2015), Kellner et al. (2016) und Nachtigal et al. (2020) gegeben. Das Pseudonym dient zur internen Zuordnung am Institut für Humangenetik, Regensburg.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten hiPSC-Klone für die einzelnen Versuche

Beschreibung des Versuchs	Verwendeter hiPSC-Klon (Pseudonym und Klonnummer)
Konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen von hiRPE-Zellen	Kontrolle: MK#22; M. Best: MW#232, MO#214, SK#16, DK#Pka, AP#187, MD#18; ARB: LA#33, MA#77, TT#180, PT#172, AT#168; ADVIRC: IS#53a, JS#52a
Messung des TEERs	Kontrolle: MK#22, MK#27b, AM#13, AM#260, NG#1; M. Best: MW#232, MO#214, SK#16, DK#Pka, DK#Pkb, AP#187, MD#18; ARB: LA#29, LA#33, MA#77, TT#178, TT#180, PT#172, PT#176, AT#166, AT#168; ADVIRC: IS#53a, IS#53b, JS#52a, JS#52b
Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression	Kontrolle: MK#22; M. Best: MW#232, MO#214, SK#16, DK#Pka, DK#Pkb, AP#187, MD#18; ARB: LA#29, LA#33, MA#74, MA#77, TT#178, TT#180, PT#172, PT#176, AT#166, AT#168; ADVIRC: IS#53a, IS#53b, JS#52a, JS#52b
Quantifizierung der BEST1 Proteinmenge in Ganzzell-Lysaten von hiRPE-Zellen zur Bestimmung des Degradationsweges	M. Best: DK#Pka, DK#Pkb, AP#187, MD#18, MW#232, MO#214, SK#16; ARB: LA#33, TT#180; ADVIRC: IS#53b, JS#52b
Quantifizierung der *BEST1* und *RPE65* mRNA Expression mittels qRT-PCR	Kontrolle: AM#13, MK#22, MK#27b, NG#1; M. Best: MW#232, MO#214, SK#16, DK#Pka, AP#187, MD#18; ARB: LA#33, MA#77, TT#180, PT#172, AT#168; ADVIRC: IS#53a, JS#52a
Quantifizierung der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay von hiRPE-Zellen	Kontrolle: MK#22, AM#13, NG#1; M. Best: MW#232, MO#214, SK#16, DK#Pka, AP#187, MD#18; ARB: LA#33, MA#77, TT#178, PT#176, AT#166; ADVIRC: IS#53a, IS#53b, JS#52a, JS#52b
Quantifizierung des lysosomalen pH-Wertes	Kontrolle: AM#13, MK#22, MK#27; M. Best: DK#Pka, MD#18; ARB: LA#33, TT#180
Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von hiRPE-Zellen zur Bestimmung des Degradationsweges	Kontrolle: MK#22, AM#260; M. Best: DK#Pka, AP#187, MD#18, MW#232, MO#214, SK#16; ARB: LA#33, TT#180; ADVIRC: IS#53b, JS#52b
Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten	Kontrolle: MK#22; M. Best: MW#232, MO#214, SK#16, DK#Pka, AP#187, MD#18; ARB: LA#33, MA#77, TT#180, PT#172, AT#168; ADVIRC: IS#53a, JS#52a
Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von hiRPE-Zellen mit CTSD nach POS-Fütterung	Kontrolle: MK#22; M. Best: DK#Pka, MD#18; ARB: LA#33, TT#180
Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von hiRPE-Zellen mit CTSD nach Behandlung mit CQ	Kontrolle: MK#22; M. Best: DK#Pka, AP#187, MD#18; ARB: LA#29, MA#77, TT#180, AT#168, PT#172
Repräsentative YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay von hiRPE-Zellen	Kontrolle: MK#22, AM#13, NG#1; M. Best: MW#232, MO#214, SK#16, DK#Pka, AP#187, MD#18; ARB: LA#33, MA#77, TT#178, PT#176, AT#166; ADVIRC: IS#53a, JS#52a

2.9.2 *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) II-Zelllinien

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten MDCKII-Zelllinien, die stabil verschiedene BEST1 Varianten exprimieren

Bezeichnung	Aminosäure-Austausch	Nukleotid-Austausch	Klinischer Befund
A195V*	A195V	584C>T	ARB
A243V	A243V	728C>T	M. Best
R141H*	R141H	422G>A	ARB
V235A	V235A	704T>C	ADVIRC
V235M	V235M	703G>A	M. Best
V239M	V239M	715G>A	ADVIRC
V86M	V86M	256G>C	ADVIRC
WT*	-	-	gesund
Y236C	Y236C	707A>C	ADVIRC

M. Best: Morbus Best; ARB: autosomal rezessive Bestrophinopathie; ADVIRC: autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie; * Zelllinien, die bereits am Institut für Humangenetik, Regensburg, vorlagen.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten MDCKII-Zelllinien, die stabil verschiedene BEST1 Varianten und YFP koexprimieren

Bezeichnung	Aminosäure-Austausch	Nukleotid-Austausch	Klinischer Befund
A243V+YFP	A243V	728C>T	M. Best
L224M+YFP*	L224M	670C>A	M. Best
MDCKII+YFP*	-	-	-
V235A+YFP	V235A	704T>C	ADVIRC
V235M+YFP	V235M	703G>A	M. Best
V239M+YFP	V239M	715G>A	ADVIRC
V86M+YFP	V86M	256G>C	ADVIRC
WT+YFP*	-	-	gesund
WT-1D4+YFP	-	-	gesund, markiert
Y227N+YFP*	Y227N	679T>A	M. Best
Y236C+YFP	Y236C	707A>C	ADVIRC

M. Best: Morbus Best; ARB: autosomal rezessive Bestrophinopathie; ADVIRC: autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie; * Zelllinien, die bereits am Institut für Humangenetik, Regensburg, vorlagen.

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten MDCKII-Zelllinien, die stabil mutiertes und markiertes wildtypisches BEST1 koexprimieren

Bezeichnung	Aminosäure-Austausch	Nukleotid-Austausch	Klinischer Befund
A243V+WT-1D4	A243V	728C>T	M. Best
V235A+WT-1D4	V235A	704T>C	ADVIRC
V235M+WT-1D4	V235M	703G>A	M. Best
V239M+WT-1D4	V239M	715G>A	ADVIRC
WT+WT-1D4	-	-	gesund
Y236C+WT-1D4	Y236C	707A>C	ADVIRC

M. Best: Morbus Best; ARB: autosomal rezessive Bestrophinopathie; ADVIRC: autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie

2.9.3 Weitere eukaryotische Zelllinien

Tabelle 15: Weitere verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Ursprungsgewebe	Herkunft
HEK293T	*Homo sapiens*	Embryonale Nierenzellen	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
MDCKII	*Canis familiaris*	Nierenzellen	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

2.10 Zellkulturmaterialien

Tabelle 16: Verwendete Medien und Zusätze für die Zellkultur und deren Hersteller

Medien/Zusätze	Hersteller
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix	Corning Inc., Corning, NY, USA
CryoStor® CS10	STEMMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Kanada
Dispase	STEMMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Kanada
DMEM (Dulbecco´s modified eagle Medium) High Glucose Medium (4,5g/L)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco‘s PBS (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fetal Bovine Serum Gold (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
G418 Sulfatlösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gentamicin (50 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kalzium-Ionophor A23187	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KnockOut™ DMEM (KnockOut™ Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
KOSR™ (KnockOut™ Serum Replacement)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
L-Glutamin 200 mM (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MG132	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Nigericin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nikotinamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
OptiMEM™ Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pluriStrainer 5µm	pluriSelect, Leipzig, Deutschland
Polybrene Infection/Transfection Reagent	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Poly-L-Lysin Hydrobromid (0,1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Puromycin Dihydrochlorid	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TesR™	STEMMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Kanada

Trypsin-EDTA	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellschaber	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

2.11 Puffer und Lösungen

Tabelle 17: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge
2x HBS	NaCl KCl Na_2HPO_4 HEPES H_2O dest.	280 mM 10 mM 1,5 mM 50 mM
5x Lämmli Buffer	Bromphenolblau Tris-HCl, pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin H_2O dest.	0,01 % (v/v) 60 mM 5 % (v/v) 2 % (w/v) 10 % (v/v)
Bromphenolblau (DNA Ladepuffer)	Bromphenolblau Glycerin H_2O dest.	0,01 % (w/v) 40 % (v/v)
Haus-Taq DNA Polymerase 10 x Puffer	KCl Tris, pH 9,0 $MgCl_2$ Triton® X-100	500 mM 100 mM 15 mM 1 % (v/v)
PB, pH 7.2	Na_2HPO_4 NaH_2PO_4 H_2O dest.	78 mM 26 mM
PFA-Lösung	PFA 1x PBS	4 % (w/v)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4 H_2O dest.	137 mM 0,27 mM 10 mM 1,8 mM
SDS-Laufpuffer, pH 8,6	Tris-HCl Glycin SDS H_2O dest.	0,25 mM 0,2 M 1 % (w/v)
Taurin-Puffer für die POS-Isolierung	NaCl $MgCl_2$ Tris-HCl, pH 7,5 Taurin H_2O dest.	5 N 1 M 1 M 100 mM
Towbinpuffer, pH 8,7	Glycin Tris Methanol H_2O dest.	190 mM 0,25 mM 20 % (v/v)
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), pH 8,0	Tris-HCl, pH 8,0 Borsäure EDTA H_2O dest.	100 mM 100 mM 1 mM

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), pH 7,5	Tris NaCl H_2O dest.	50 mM 150 mM
Xylencyanol-Puffer (DNA Ladepuffer)	Xylencyanol Glycerin 87 %	0,1 % w/v 40 % w/v

2.12 Geräte

Tabelle 18: Verwendete Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Accu-jet Pipet Kontroller	Brand, Wertheim, Deutschland
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Brutschrank für Bakterien 37°C	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Bunsenbrenner Gasprofi1	WLD Tec, Göttingen, Deutschland
CASY® Zellzählgerät + Analyse-System Model TT	Roche Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland
CO_2-Inkubator 37 °C	Kendro Lab Products, Langenselbold, Deutschland
Duomax 1030 Rocking Platform Shaker	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
E1-ClipTip™ Equalizer Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eismaschine AF 100	Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA
Epithelialen Volt/Ohm Meter (EVOMX)	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Feinwaage Explorer	OHAUS, Nänikon, Schweiz
FLUOstar® OPTIMA Microplate Reader	BMG Labtech, Allmendgruen, Deutschland
FV3000 Fluorview	Olympus Life Sciences, Hamburg, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelkammer Blue Marine200	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glasplatten Mini PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Inkubator Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Invertiertes Routine-Mikroskop ECLIPSE Ts2	Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokyo, Japan
Leica DM IL Inverted Phase Contrast Microscope 090-135.001	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Matrix Equalizer Pipet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrowelle KOR-6D07	Daewoo, Seoul, Korea
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore)
NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Netzgerät Blue Power 500	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Netzgerät Blue Power Plus	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Odyssey® FC-Scanner	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA

pH Meter Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Pipettierhilfe Accu-jet	Brand, Wertheim, Deutschland
QuantStudio® 5 Real-Time PCR System	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RM5 Roller	(Assistent®) Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Rotator RS-24	Biosan, Riga, Lettland
ScanLaf biologische Sicherheitswerkbank Klasse 2 - Mars	LaboGene A/S, Allerød, Dänemark
Schüttelinkubator Ceromat R	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
SDS-PAGE Platten 1,5mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sicherheitswerkbank BDK-SK1800	Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen, Deutschland
Spark® Multimode Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Spectralphotometer Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermocyler Peqstar 2x gradient	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Transferpipette® 10 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette® 100 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette® 1000 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Transilluminator UST-30 M-8R	BioView Ltd., Billerica, MA, USA
Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400	Sonics & Materials, Newtown, CT, USA
Vakuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Vibra Cell VCX400 Ultrasound device	Sonics & Materials, Newtown, CT, USA
VisiScope CSU-X1 Confocal System Microscope	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Werkbank Heraguard	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 3l	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.13 Software

Tabelle 19: Verwendete Software und deren Hersteller

Software	Hersteller
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
CorelDRAW® X8	Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada
Image Studio Version 4.0	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
ImageJ 1.51g (Fiji)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
LSM Image Browser Software Version 4.0.0.157	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microsoft Office 2016	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
NIS-Elements BR 3.0	Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokio, Japan
QuantStudio™ Design & Analysis Software Version 1.4.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
R Version 3.4.4	R Foundation, Wien, Österreich
SigmaPlot Version 14.0	Systat Software, San Jose, CA, USA
SnapGene® Version 2.8.2	GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA
Spark® Control Method Editor	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

3 Methoden

3.1 Generierung und Kultivierung von BEST1-exprimierenden Zellmodellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei einem konstanten CO_2-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Sämtlichen Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Puffern, Medien und Lösungen durchgeführt. Die Lagerung der verwendeten Zellkulturmedien erfolgte bei 4 °C und vor Benutzung wurden diese auf Raumtemperatur (RT) gebracht. Die Konfluenz und der Zustand der Zellen wurden vor jedem Passagieren und jedem Experiment unter einem Mikroskop überprüft.

3.1.1 Humane iRPE-Zellen

3.1.1.1 Differenzierung und Kultivierung von hiRPE-Zellen

Am Institut für Humangenetik, Regensburg, lagen zu Beginn dieser Arbeit eine Reihe von Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zelllinien vor. Die Reprogrammierung von Fibroblasten der Patienten in hiPSCs und die anschließende Differenzierung in Zellen des RPEs erfolgte nach einem Protokoll, das am Institut für Humangenetik, Regensburg, etabliert worden ist (Brandl et al., 2014; Brandl et al., 2015; Milenkovic et al., 2015; Nachtigal et al., 2020).

Standardmäßig wurden hiRPE-Zellen nach dem Auftauen zweimal passagiert und für deren Polarisierung mindestens fünf Wochen auf Transwell-Filtern bzw. auf schwarzen 96-Well-Microtiter-Platten in hiRPE-Medium kultiviert (KnockOut™ DMEM versetzt mit 20 % (v/v) KOSR™, 5 µg/ml Gentamicin, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 10 mM Nikotinamid und 0,1 mM β-Mercaptoethanol). Zum Passagieren wurden die Zellen mittels TrypLE™-Inkubation von Platten oder Transwell-Filtern gelöst. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm pelletiert und in frischem hiRPE-Medium aufgenommen. Zellkulturplatten und Transwell-Filter wurden mit Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix nach Angaben des Herstellers beschichtet.

3.1.1.2 Generierung von hiRPE-Zelllinien, die stabil YFP exprimieren

3.1.1.2.1 Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung von lentiviralen Partikeln mittels der Kalziumphosphat-Methode

HEK293T-Zellen wurden mittels der Kalziumphosphat-Methode transfiziert, um lentivirale Partikel mit dem Fluoreszenzprotein $YFP_{H148Q/I152L}$ (*yellow fluorescent protein*) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Luis J. V. Galietta) (Galietta et al., 2001) zu generieren. Durch die beiden Mutationen H148Q und I152L im YFP ist die Sensitivität für Chlorid- und Iodid-Ionen erhöht. Zur Transfektion wurden am vorherigen Tag HEK293T-Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichtete 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 70 % erreichen. Am Tag der Transfektion wurde das HEK293T-Medium (DMEM High Glucose Medium versetzt mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Pen/Strep) durch Kulturmedium, das zusätzlich 25 µM Chloroquin (CQ) enthält, ausgetauscht. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde frisches HEK293T-Medium hinzugegeben. HEK293T-Zellen wurden mit pLJM1-EYFP-H148Q/I152L (Jayaraman et al., 1999; Nachtigal et al., 2020) und den Helferplasmiden pMD2.G und psPAX2 kotransfiziert. Der Transfektionsansatz (**Tabelle 20**) wurde tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Sechs h nach der Transfektion erfolgte ein Wechsel mit frischem HEK293T-Medium. Nach weiteren 72 h wurde der produzierte lentivirale Überstand abgenommen, steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 20: Transfektionsansatz für die Kalziumphosphat-Methode

Komponente	Menge/Volumen
pLJM1-EYFP-H148Q/I152L	10,5 µg
pMD2.G	3,5 µg
psPAX2	7 µg
H_2O (Millipore)	417 µl
$CaCl_2$ (2M)	62 µl
2x HBS	500 µl

3.1.1.2.2 Virale Transduktion mittels Spinfektion

Humane iRPE-Zellen wurden am Tag vor der Transduktion auf 6-Well-Platten ausgesät, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 70 % erreichen. Am Tag der Transduktion wurde der Virusüberstand bei RT aufgetaut, mit 6 µg/ml Polybrene Infection/Transfection Reagent versetzt und tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die 6-Well-Platten für 80 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Spinfektion), die Zellen zweimal gewaschen und zuletzt frisches hiRPE-Medium hinzugegeben. Eine positive Transduktion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Zur Selektion wurde nach 72 h das hiRPE-Medium zusätzlich mit 3 µg/ml Puromycin Dihydrochlorid versetzt.

3.1.2 MDCKII-Zelllinien, die stabil verschiedene BEST1 Varianten exprimieren

3.1.2.1 Transfektion von MDCKII-Zellen mittels Lipofectamine® 3000

Zur Generierung von MDCKII-Zelllinien, die verschiedene BEST1 Varianten exprimieren, wurden diese mittels Lipofectamine® 3000 Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers mit 5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion auf 6-Well-Platten ausgesät, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 70 % erreichen. Am Tag der Transfektion wurde das MDCKII-Medium (DMEM High Glucose Medium versetzt mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Pen/Strep) erneuert und der Transfektionsansatz (**Tabelle** 21) nach Angaben des Herstellers tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Zur Selektion wurden nach weiteren 72 h zu dem MDCKII-Medium 500 mg/ml G418 Sulfatlösung gegeben.

Tabelle 21: Transfektionsansatz mit Lipofectamine® 3000

Komponente	Volumen
OptiMEM™ Medium	250 µl
Plasmid-DNA (s. **Tabelle 4**)	5 µg
P3000 Reagenz	10 µl
OptiMEM™ Medium	250 µl
Lipofectamine® 3000 Reagenz	10 µl

3.1.2.2 Generierung von MDCKII-Zellen, die mutiertes oder wildtypisches BEST1 sowie YFP koexprimieren

Zur Generierung von Koexpressions-Zelllinien wurden MDCKII-Zelllinien aus **Abschnitt 3.1.2.1** zusätzlich lentiviral mit $YFP_{H148Q/I152L}$ oder wildtypischem BEST1 transduziert. Die Herstellung des lentiviralen Überstandes und die Spinfektion erfolgte wie in **Abschnitt 3.1.1.2.1** und **Abschnitt 3.1.1.2.2** beschrieben. Als Plasmid-DNA wurden pLJM1-EYFP-H148Q/I152L bzw. hBest1-WT-1D4-pLJM1 verwendet. Letzteres enthält die wildtypische humane *BEST1* cDNA Sequenz mit einer C-Terminalen Rho1D4-Markierung. Eine positive Transduktion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Zur Selektion wurde nach 72 h das MDCKII-Medium inkl. 500 mg/ml G418 Sulfatlösung zusätzlich mit 3 µg/ml Puromycin Dihydrochlorid versetzt.

3.1.2.3 Generierung von Zelllinien aus Einzelzellen mittels Grenzverdünnungsklonierung

Zur Generierung stabiler klonaler Zellpopulationen wurden Grenzverdünnungsklonierungen (*single-cell cloning)* durchgeführt, um sicherzustellen, dass jede einzelne Zelle einer Zelllinie das gewünschte BEST1 Konstrukt exprimiert. Die manipulierten und selektionierten MDCKII-Zellen wurden dafür auf eine Zelldichte verdünnt, die in der Theorie genau einer Zelle pro Well einer 96-Well-Platte entspricht und ausgesät. Nur Wells, in denen sich eine Kolonie aus einer Einzelzelle entwickelte, wurden auf 24-Well-Platten expandiert. Mittels immunzytochemischer Färbung und Western Blot Analyse wurden diejenigen Zellklone identifiziert, die das gewünschte Konstrukt zu 100 % exprimieren. In weiteren Schritten wurden diese Zellen isoliert expandiert und für Experimente verwendet. Dasselbe Verfahren wurde für die MDCKII-Koexpressions-Zelllinien angewendet.

3.1.2.4 Kultivierung von MDCKII-Zelllinien

Standardmäßig wurden MDCKII-Zellen in DMEM High Glucose Medium versetzt mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Pen/Strep kultiviert. Das Kulturmedium von einfach transfizierten MDCKII-Zelllinien wurde zusätzlich mit 500 mg/ml G418 Sulfatlösung und das Kulturmedium der MDCKII-Koexpressions-Zelllinien mit 500 mg/ml G418 Sulfatlösung sowie 3 µg/ml Puromycin Dihydrochlorid versetzt.

Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden diese 20 min mit 0,02 % (v/v) EDTA in DPBS inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch eine weitere Inkubation von 3 min mit 1x Trypsin-EDTA von der Zellkulturplatte gelöst, 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Damit BEST1 Protein an der PM lokalisiert, wurden die Zellen vor jedem Versuch polarisiert. Dazu wurden diese auf 6-Well-Platten oder schwarzen 96-Well-Microtiter-Platten so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 100 % erreichen. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Zellen für 5 Tage in reduziertem Kulturmedium, das lediglich 1 % (v/v) FCS enthält, kultiviert. Somit wird ein Überwachsen des konfluenten, einschichtigen Zellrasens verhindert.

3.2 Behandlung von hiRPE- und MDCKII-Zellen für Zellkulturversuche

Humane iRPE- und MDCKII-Zellen wurden mit Cycloheximid (CHX), CQ, MG132 oder Thapsigargin (TG) behandelt. Die Reagenzien wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (**Tabelle 22**) den entsprechenden Kulturmedien immer frisch zugesetzt. Humane iRPE-Zellen wurden nach 12 h und MDCKII-Zellen nach 7 h Inkubation bei 37 °C geerntet.

Tabelle 22: Verwendete Konzentrationen zur Behandlung von hiRPE- und MDCKII-Zellen für Zellkulturversuche

Komponente	Zellmodell	Konzentration
CHX	hiRPE	20 µg/ml
	MDCKII	20 µg/ml
CQ	hiRPE	100 µM
	MDCKII	50 µM
MG132	hiRPE	40 µM
	MDCKII	20 µM
TG	MDCKII	1 µM

3.3 Immunzytochemie (ICC)

Polare hiRPE-Zellen, kultiviert auf Transwell-Filtern, oder MDCKII-Zellen, ausgesät und kultiviert auf 6 mm-Deckgläschen, wurden zur immunzytochemischen Färbung zuerst für 10 min mit 4 % Paraformalehyd (PFA) fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit 1x DPBS gewaschen und anschließend 25 min in Blocklösung inkubiert. Die Inkubation der primären und sekundären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die Zusammensetzung der Antikörperlösungen ist in **Tabelle 23** und die verwendeten Konzentrationen in **Tabelle 5** und **Tabelle 6** gegeben. Zwischen dem Wechsel der Lösungen und vor dem Einbetten mit DAKO Fluorecence Mounting Medium wurden die Zellen dreimal mit 1x DPBS gewaschen. Die Präparate wurden nach vollständigem Trocknen unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (LSM 510 oder LSM 700 Laser Scanning Microsope, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) ausgewertet und die Aufnahmen mit der Zeiss LSM Image Browser Software Version 4.0.0.157 bearbeitet.

Tabelle 23: Zusammensetzung der Lösungen für die Immunzytochemie

Lösung	Zusammensetzung	Menge
Blocklösung	Ziegenserum	10 % (v/v)
	Triton® X-100	0,3 % (v/v)
	10x DPBS	10 % (v/V)
Primärantikörper-Lösung	Primärantikörper	Konzentration s. **Tabelle 5**
	Ziegenserum	0,25 % (v/v)
	Triton® X-100	0,1 % (v/v)
	NaN_3	0,02 % (v/v)
	10x DPBS	10 % (v/v)
Sekundärantikörper-Lösung	Sekundärantikörper	Konzentration s. **Tabelle 6**
	DAPI	0,04 mg/ml (w/v)
	Ziegenserum	0,25 % (v/v)
	Triton® X-100	0,1 % (v/v)
	10x DPBS	10 % (v/v)

3.4 RNA-Isolierung, Reverse Transkriptase (RT), RT-PCR und qRT-PCR

Gesamt-RNA wurde mittels des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers inkl. eines enzymatischen DNA-Verdaus isoliert. Die RNA wurde in 35 µl RNase-freiem H_2O eluiert und die Konzentration am NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer gemessen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Für die cDNA-Synthese wurde ein finales Reaktionsvolumen von 12,5 µl verwendet. Hierfür wurde 1 µg Gesamt-RNA jeder Probe mit RNase-freiem H_2O auf die gleiche Endkonzentration verdünnt, welche durch die Probe mit der niedrigsten Konzentration vorgegeben wurde, und anschließend 1 µl Random Hexamer Primer hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert (Schritt 1 in **Tabelle 24**). Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und 7,5 µl des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese hinzugegeben (**Tabelle 25**). **Tabelle 24** stellt die nachfolgenden Schritte des Thermocycler-Programms für die cDNA-Synthese dar. Zuletzt wurde die cDNA auf eine Konzentration von 20 ng/µl mit RNase-freiem H_2O verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 24: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Schritt 1: Annealing	65 °C	5 min
Schritt 2: cDNA-Synthese und Hitzeinaktivierung	25 °C	10 min
	42 °C	1 h
	70 °C	15 min
	4 °C	∞

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen
RNase-freies H_2O	0,5 µl
5x Reaction Buffer für RevertAid™ Reverse Transkriptase	4 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
RevertAid™ Reverse Transkriptase	1 µl

Für die RT-PCR mit der GoTaq® DNA-Polymerase wurden 50 ng cDNA eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Thermocycler-Programm sind in **Tabelle** 26 und **Tabelle 27** dargestellt. Es wurden die Primerpaare Tu15newF2/Tu15newR1 (Annealingtemperatur: 52 °C), huXBP1-F/dogXbp1-R (Annealingtemperatur: 55 °C) und GAPDH-F/GAPDH-R (Annealingtemperatur: 58 °C) verwendet (**Tabelle 8**). Die PCR-Produkte wurden je nach Größe auf einem 1,5 oder 2,5 %-igem Agarosegel aufgetrennt.

Tabelle 26: Reaktionsansatz für die RT-PCR mit der GoTaq® DNA-Polymerase

Komponente	Volumen
H_2O (Millipore)	13,9 µl
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
Template-DNA (50 ng)	2 µl
GoTaq® DNA Polymerase	0,1 µl

Tabelle 27: Thermocycler-Programm für die RT-PCR mit der GoTaq® DNA-Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Schritt 1: Denaturierung	94 °C	30 s	33
Schritt 2: Annealing	x °C	30 s	
Schritt 3: Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Ende	10 °C	∞	

Für die qRT-PCR wurden alle Primer mit Hilfe der „Universal Probe Library“ (Hoffmann-La Roche, Basel) designed (**Tabelle 9**). Die qRT-PCR wurde mit dem TaqMan® Gene Expression Master Mix nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems durchgeführt. Dabei wurde jede Probe in Triplikaten auf einer 348-Well-Platte analysiert. Der Reaktionsansatz und das Thermocycler-Programm sind in **Tabelle 28** und **Tabelle 29** dargestellt. Die Daten wurden nach der ΔΔCT-Methode ausgewertet.

Tabelle 28: Reaktionsansatz für die qRT-PCR

Komponenten	Volumen
H_2O (Millipore)	0,375 µl
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	5 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
Sonde	0,125 µl
cDNA (20 ng/µl)	2,5 µl

Tabelle 29: Thermocycler-Programm für die qRT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Schritt 1: Denaturierung	95 °C	40 s	40
Schritt 2: Annealing	60 °C	60 s	
Schritt 3: Elongation	72 °C	2 min	

3.5 Extraktion genomischer DNA (gDNA), PCR-Amplifikation und Sanger-Sequenzierung

Genomische DNA (gDNA) wurde aus hiRPE-Zellen nach Laird et al. (1991) isoliert. Zur Amplifikation der BEST1 Exone aus gDNA und cDNA wurde eine PCR mit der GoTaq® DNA-Polymerase nach **Abschnitt 3.4** durchgeführt. Der Reaktionsansatz und das verwendete Thermocycler-Programm sind in den **Tabelle 26** und **Tabelle 27** dargestellt. Es kamen die Primerpaare N11K-EcoRI-F/N11K-BamHI-R (gDNA, Exon 2, Annealingtemperatur: 58 °C), Tu15_NEW_F4/Tu15_Race_1H (cDNA, Exon 2, Annealingtemperatur: 58 °C), Tu15_NEW_F6/dogBest1_R (gDNA, Exon 10, Annealingtemperatur: 58 °C), Tu15newF6/hVMD2-RT-R (cDNA, Exon 10, Annealingtemperatur: 58 °C) und hBest1_F_NheI/hBest1_R_MluI (cDNA volle Länge, Annealingtemperatur: 58 °C, Elongationszeit: 1,5 min) zum Einsatz (**Tabelle 8**).

Anschließend wurde das amplifizierte PCR-Produkt enzymatisch mit Exo und SAP behandelt. Der Reaktionsansatz und das Thermocycler-Programm sind in den **Tabelle 30** und **Tabelle** 31 dargestellt.

Tabelle 30: Reaktionsansatz für die enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten mit Exo und SAP

Komponente	Volumen
H_2O (Millipore)	3,65 µl
Exo	0,1 µl
SAP	0,25 µl
PCR-Produkt	1 µl

Tabelle 31: Thermocycler-Programm für die enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten mit Exo und SAP

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Schritt 1	37 °C	15 min
Schritt 2	80 °C	15 min

Die Sanger-Sequenzierung der amplifizierten PCR-Produkte wurde mit dem BigDye® Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. **Tabelle 32** und **Tabelle 33** stellen den Reaktionsansatz und das verwendete Thermocycler-Programm dar. Die Sequenzierung erfolgte mit einem der beiden Primer, die für die Amplifizierung der BEST1 Exone eingesetzt worden ist (**Tabelle 8**).

Tabelle 32: Reaktionsansatz für die Sanger-Sequenzierung

Komponente	Volumen
H_2O (Millipore)	1,7 µl
BigDye® Terminator Sequencing Buffer	2 µl
Primer (10 µM)	1 µl
BigDye® Terminator Reacting Buffer	0,3 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	5 µl

Tabelle 33: Thermocycler-Programm für die Sanger-Sequenzierung

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Schritt 1: Denaturierung	94 °C	15 min	27
Schritt 2: Annealing	58 °C	30 s	
Schritt 3: Elongation	60 °C	3 min	
Finale Elongation	60 °C	5 min	
Pause	4 °C	∞	

Zur Fällung der DNA wurde zu der Sequenzierungsreaktion 5 µl 125 mM EDTA und 50 µl 100 %-iger Ethanol gegeben. Die Proben wurden gemischt, bei RT für 10 min inkubiert und bei 4 °C für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl 70 %-igen Ethanol gewaschen und nochmals bei 4 °C für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde die DNA in 20 µl HiDi™ Formamid gelöst und auf einem Abi3130X1 Genetic Analyzer analysiert.

3.6 Gewinnung von Proteinproben, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

Zur Gewinnung von Proteinproben aus hiRPE- oder MDCKII-Zellen wurden diese mit einem Zellschaber von Transwell-Filtern bzw. Zellkulturplatten gelöst, pelletiert und einmal mit 1x DPBS gewaschen. Bei hiRPE-Zellen wurde zuvor die Membran des Transwell-Filters ausgeschnitten. Das Pellet wurde in 1x Lämmli-Puffer verdünnt in 1x TBS aufgenommen und 8 s mit einer Amplitude von 36 % mit dem Vibra-Cell Sonicator sonifiziert. Für eine Probe von hiRPE-Zellen wurden drei Transwell-Filter in 230 µl 1x Lämmli-Puffer vereinigt. Für eine Probe von MDCKII-Zellen wurde ein Well einer 6-Well-Platte verwendet und in 300 µl 1x Lämmli-Puffer gelöst. Anschließend wurden die Proben bei 94 °C für 5 min aufgekocht und auf einer reduzierenden SDS-PAGE mittels eines 10 %-igen (für BEST1 und Rho-1D4) bzw. 12,5 %-igen (für CTSD) Acrylamidgels aufgetrennt.

Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels ist in **Tabelle 34** und **Tabelle 35** dargestellt. Von jeder Probe wurde 90 µl geladen. Als Molekularmassenstandard dienten 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 2 h.

Tabelle 34: Zusammensetzung des Acrylamid-Sammelgels

Komponente	Volumen
1 M Tris-HCl, pH 6,8	0,55 M
BIS/Acrylamid 40 % (w/v)	11 % (v/v)
SDS 20 % (w/v)	0,1 % (w/v)
APS 10 % (w/v)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,2 % (v/v)

Tabelle 35: Zusammensetzung des Acrylamid-Trenngels

Komponente	Volumen
1 M Tris-HCl, pH 8,8	0,383 M (für 10 %) 0,479 M (für 12,5 %)
BIS/Acrylamid 40 % (w/v)	11 % (v/v)
SDS 20 % (w/v)	0,1 % (w/v)
APS 10 % (w/v)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,2 % (v/v)

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Semi-Dry-Blotting-Verfahren unter Verwendung des Bio-Rad Transblot Transfer Systems auf eine Immobilon-FL PVDF Membran transferiert. Hierzu wurden zuerst die Membranen in Methanol für 30 s aktiviert und zusammen mit zwei 3 mm Whatman-Papieren und den SDS-Gelen in 1x Towbin-Puffer versetzt mit 20 % Methanol für 5 min equilibriert. Der anschließende Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 40 min bei 24 V. Danach wurden die Membranen mit 4 % Magermilch-Pulver in 1x TBS für 1 h bei RT geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation der primären und sekundären Antikörper bei 4 °C über Nacht. **Tabelle 36** listet die Zusammensetzung der Antikörperlösungen auf. Zwischen der Inkubation mit den verschiedenen Antikörperlösungen wurden die Membranen dreimal 20 min bei RT mit 1x TBS gewaschen. Zuletzt wurden die Proteinbanden am Odyssey® FC-Scanner detektiert und mit der Software Image Studio Version 4.0 analysiert.

Tabelle 36: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für die Western Blot Analyse

Lösung	Zusammensetzung	Menge
Primärantikörper-Lösung	Primärantikörper	Verdünnung s. **Tabelle 5**
	Odyssey Blocking Buffer (TBS)	10 % (v/v)
	NaN_3	0,02 % (w/v)
	1x TBS	
Sekundärantikörper-Lösung	Sekundärantikörper	Verdünnung s. **Tabelle 6**
	Odyssey Blocking Buffer (TBS)	10 % (v/v)
	1x TBS	

3.7 Halogenidtransport-Assay

Humane iRPE-Zellen, die $YFP_{H148Q/I152L}$ exprimieren, wurden fünf Wochen bis zum Erreichen der Polarität auf schwarzen 96-Well-Microtiter Platten kultiviert. Am Tag der Messung wurden die Zellen 6 min mit Natriumiodid-Lösung, die mit dem Kalzium-Ionophor A23187 (5 µM) versetzt war, inkubiert. Das durch Iodid gequenchte YFP-Fluoreszenzsignal wurde am FLUOstar OPTIMA Microplate Reader gemessen. Anschließend wurde die Natriumiodid-Lösung mit äquimolarer Natriumchlorid-Lösung inkl. 5 µM A23187 ausgetauscht. Die YFP-Fluoreszenzintensitäten wurden in 60 s Intervallen über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Die Messung der YFP-Fluoreszenzintensitäten von MDCKII-Zellen, die BEST1 und $YFP_{H148Q/I152L}$ koexprimieren, erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Lediglich wurden die MDCKII-Zellen fünf Tage bis zum Erreichen der Polarität auf schwarzen 96-Well-Microtiter Platten kultiviert und die Messung wurde am Spark® Multimode Microplate Reader durchgeführt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in **Tabelle 37** aufgelistet.

Tabelle 37: Zusammensetzung der Lösungen für den Halogenidtransport-Assay

Lösung	Komponente	Menge
Natriumchlorid-Lösung	Natriumchlorid	100 mM
	Kaliumchlorid	5 mM
	Magnesiumchlorid	1 mM
	Kalziumchlorid	1,5 mM
	HEPES	10 mM
	Glukose	5 mM
Natriumiodid-Lösung	Natriumiodid	100 mM bzw. 40 mM
	Kaliumchlorid	5 mM
	Magnesiumchlorid	1 mM
	Kalziumchlorid	1,5 mM
	HEPES	10 mM
	Glukose	5 mM

3.8 Messung des transepithelischen/transendothelischen elektrischen Widerstands (TEER)

Der transepithelische/transendothelische elektrische Widerstand (*transepithelial/transendothelial electrical resistance*, TEER) wurde von polaren hiRPE-Zellen gemessen, die für fünf Wochen auf 6-Well-Transwell-Filtern kultiviert worden sind. Die Messung erfolgte mit einem Epithelialen Volt/Ohm Meter (EVOMX) wie in Brandl et al. (2014) beschrieben. Kurzgefasst, wurden die Elektroden mit 70 %-igen Ethanol sterilisiert, in 150 mM Natriumchlorid-Lösung getaucht und so in den Transwell-Filter platziert, dass die lange Spannungselektrode unterhalb des Filters den Boden des Wells berührt, während die kurze Spannungselektrode oberhalb des Filters positioniert ist. Als Referenz-Werte dienten Messungen von Transwell-Filtern ohne Zellen, lediglich beschichtet mit Matrigel GFR. Die Referenz-Werte wurden von den gemessenen TEER-Werten subtrahiert und zuletzt mit der Fläche eines Transwell-Filters multipliziert, um so $\Omega*cm^2$ zu erhalten.

3.9 Isolierung und Fütterung von porzinen Photorezeptor-Außensegementen (*photoreceptor outer segements*, POS)

Die Isolierung von POS aus porzinen Retinae erfolgte via Ultrazentrifugaton nach Brandl et al. (2014). Kurzgefasst, wurden porzine Retinae mit 20 % (w/v) Saccharose in Taurin-Puffer und einem Proteaseinhibitor homogenisiert. Hierfür wurden die aufgetauten Retinae zuerst durch eine Mullbinde filtriert, mit 5 ml-Pipetten und 1000 µl-Pipetten weiter homogenisiert und anschließend mittels Dichtegradienten-Zentrifugation bei 26.000 rpm in einem SW 40 Ti Ausschwingrotor für 2 h bei 4 °C aufgetrennt. Die ringförmig angereicherte rosafarbene Fraktion, die die POS enthält, wurde abgenommen und in 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. In drei Waschschritten wurden die Proben mit OptiMEM™ Medium bei 12.000 rpm für 5 min zentrifugiert und die Pellets nach und nach vereinigt. Zuletzt wurden die nun gereinigten POS in 20 ml OptiMEM™ Medium versetzt mit 1 % (v/v) Pen/Strep gelöst, die Protein-Konzentration mittels Bradford-Test bestimmt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für Experimente, bei denen hiRPE-Zellen mit POS gefüttert worden sind, wurden die POS auf Eis aufgetaut, in Opti-MEM™ Medium verdünnt und in einem Ultraschall-Wasserbad für 5 min mit einer Frequenz von 10 % sonifiziert. Danach wurden die POS durch ein 5 µm Zellsieb passiert und in frischem hiRPE-Medium resuspendiert. Humane iRPE-Zellen, kultiviert auf 6-Well-Transwell-Filter (zur Bestimmung des Cathepsin D (CTSD) Reifegrades) oder schwarzen 96-Well Mikrotiter-Platten (zur Messung des lysosomalen pH-Wertes), wurden für 2 h oder 24 h mit ~20 POS/Zelle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit KockOut™

DMEM gewaschen, um nicht-phagozytierte POS zu entfernen. Zur Bestimmung der Reifung von CTSD, wurden Proteinproben nach **Abschnitt 3.6** gewonnen und die Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.10 Messung des lysosomalen pH-Wertes in hiRPE-Zellen

Die Messung des lysosomalen pH-Wertes (pH_{Lys}-Werte) von hiRPE-Zellen wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Farbstoffs LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160 nach Anleitung des Herstellers gemessen. Hierzu wurden die Zellen, kultiviert auf schwarzen 96-Well-Microtiter-Platten, mit 1 µM LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160 gelöst in isotoner Lösung (20 mM MES, 5 mM KCl, 120 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose; pH 7,4) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 330 nm und 385 nm auf dem Spark® Multimode Microplate Reader gemessen. Eine Kalibrierungskurve wurde für jede Zelllinie auf einer schwarzen 96-Well-Mikrotiter-Platte generiert, indem die Zellen für 15 min bei 37 °C mit isotoner Lösung unterschiedlicher pH-Werte inkubiert worden sind (pH 3,0 - 5,0). Nigericin (10 µM) und Monensin (10 µM) Natriumsalz wurden hinzugefügt, um den intrazellulären pH-Wert aufzulösen.

3.11 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler (SE) oder Standardabweichung (SD) angegeben. Der Test auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilks-Test in R Version 3.4.4 (R Core Team, 2018). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode (Benjamini und Hochberg, 1995; Pollard et al., 2005; Ogle et al., 2019). Signifikanzen wurden angegeben mit * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** $p = < 0,001$ und n. s. = nicht signifikant. Die graphische Darstellung erfolgte mittels SigmaPlot Version 14.0 und CorelDRAW® X8.

4 Ergebnisse

4.1 Korrelation zwischen der Lokalisation von *BEST1* Mutationen in der Kanalstruktur und einem Krankheitsbild der Bestrophinopathien

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen einem spezifischen Krankheitsbild der Bestrophinopathien und der Lokalisation der zugrundeliegenden *BEST1* Mutation in dem Ionenkanal besteht, wurden krankheitsverursachende *BEST1* Mutationen in der Kristallstruktur von normalem cBEST1 markiert. Ausgewählt wurden hierfür 56 M. Best-, 16 ARB- und fünf ADVIRC-assoziierte Mutationen. Die Auswahlkriterien sind in Nachtigal et al. (2020) gegeben. Es zeigte sich, dass M. Best-assoziierte (**Abbildung 3A**) und im Besonderen die ADVIRC-assoziierten (**Abbildung 3B**) Mutationen in der „Hals-Region“ und in den benachbarten Helices bzw. in der Transmembrandomäne des BEST1-Ionenkanals liegen. Dagegen befinden sich die ARB-assoziierten Mutationen primär an den extra- und intrazellulären Enden der Struktur (**Abbildung 3C**).

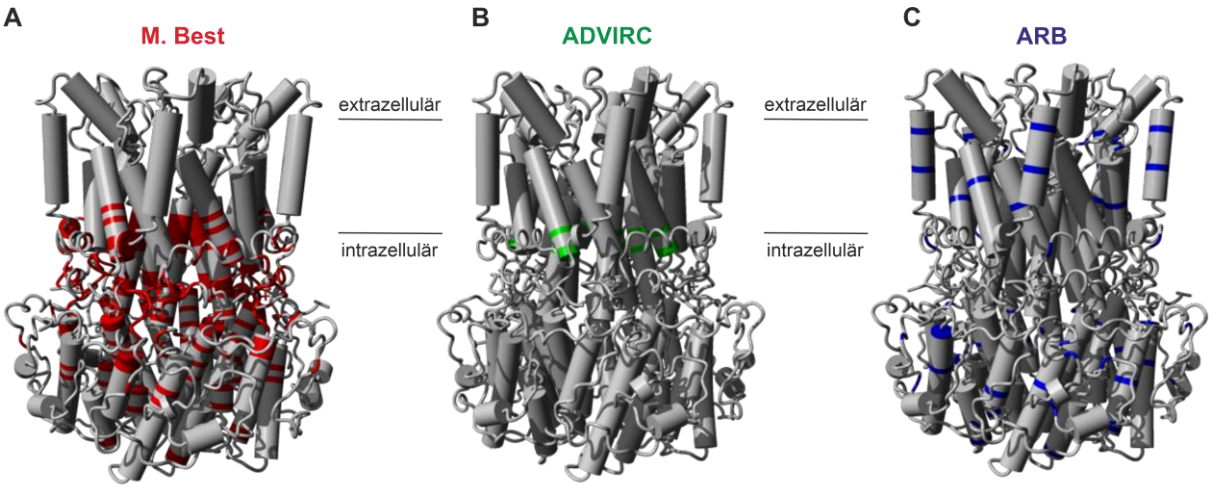


Abbildung 3: Kristallstruktur von normalem cBest1 mit markierten krankheitsverursachenden *BEST1* Mutationen. Markiert sind **(A)** M. Best- (rot), **(B)** ADVIRC- (grün), und **(C)** ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen (blau). Die Transmembrandomäne befindet sich zwischen dem extra- und intrazellulären Bereich des Kanals. Die eingezeichneten Mutationen und die zugrundeliegenden Auswahlkriterien sind in Nachtigal et al. (2020) gegeben. Die *in silico* Modellierung erfolgte durch Heidi L. Schulz, ehemals Institut für Humangenetik, Regensburg. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

4.2 Humane iRPE-Zelllinien als *in vitro* Modell zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien

Humane iRPE-Zellen bilden ein physiologisches *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien, da sie der nativen RPE-Struktur sehr nahekommen und vor allem endogen BEST1 Protein exprimieren (Brandl et al., 2014). Am Institut für Humangenetik, Regensburg, wurde ein Protokoll etabliert, mit dem Fibroblasten aus

Patienten-Hautbiopsien in hiPSC reprogrammiert, welche dann wiederum in Zellen des RPEs differenziert werden können (Brandl et al., 2014; Brandl et al., 2015; Milenkovic et al., 2015; Nachtigal et al., 2020). Zu Beginn dieser Arbeit waren am Institut für Humangenetik, Regensburg, insgesamt 16 hiRPE-Zelllinien etabliert: drei Zelllinien von unverwandten gesunden Spendern (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3), sechs Zelllinien von M. Best Patienten (+/N11K, +/R218C, +/Q238R, +/A243V und zwei unverwandte Patienten +/I295del #1 und +/I295del #2), zwei Zelllinien von ADVIRC Patienten (verwandte Patienten +/V86M #1 und +/V86M #2) und zwei Zelllinien von ARB Patienten inklusive der gesunden Eltern (N99K/R141H, A195V/L197PX26, +/R141H, +/A195V und +/L197PX26) (**Tabelle 10**). Da mehrere Differenzierungsversuche qualitativ ungenügende hiRPE-Zellen des ARB Elternteils +/N99K hervorbrachten, welche nicht die typische hexagonale Morphologie vorwiesen und sich von der Zellkulturplatte ablösten, wurden diese Zellen nicht in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit miteinbezogen. Um der Variabilität im Differenzierungsprozess entgegen zu wirken, wurden für zehn der 16 Zelllinien mehrere unabhängige hiPSC-Klone analysiert. **Tabelle 11** gibt an, für welches Experiment, welcher hiPSC-Klon verwendet wurde.

4.2.1 Charakterisierung von M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zelllinien mittels TEERs sowie bezüglich der BEST1 Lokalisation, RNA- und Proteinexpression

Um die 16 hiRPE-Zelllinien zu charakterisieren, wurde zum einen der TEER gemessen und zum anderen die Lokalisation, die RNA- sowie die Proteinexpression von BEST1 bestimmt.

Ein hoher TEER-Wert spiegelt die Dichte des hiRPE-Zellrasens und die Ausbildung von Schlussleisten (*tight junctions*) wider und ist somit ein Merkmal für die Barrierefunktion des RPEs. In Studien finden sich für verschiedene Spezies sowie Zelltypen TEER-Werte zwischen 100 $\Omega*cm^2$ und 1500 $\Omega*cm^2$, welche stark von der Messmethode, den Kultivierungsbedingungen, der Temperatur und dem CO_2-Gehalt beeinflusst werden (Rizzolo, 2014; Chen et al., 2015; Srinivasan et al., 2015).

Alle in dieser Arbeit untersuchten hiRPE-Zellen zeigten hohe TEER-Werte, die zwischen 595 $\Omega*cm^2$ und 1435 $\Omega*cm^2$ lagen (**Tabelle 38**).

Tabelle 38: TEER von hiRPE-Zellen nach einer Kultivierung von fünf Wochen auf Transwell-Filtern

BEST1 Genotyp	hiPSC-Klon	TEER (Ω*cm²)
+/+ #1	MK#22	647 ± 39
	MK#27b	1197 ± 66
+/+ #2	AM#13	755 ± 83
	AM#260	884 ± 75
+/+ #3	NG	868 ± 81
+/N11K	MW#232	777 ± 73
+/R218C	MO#214	1072 ± 56
+/A243V	SK#16	855 ± 86
+/Q238R	DK#Pka	1089 ± 136
+/I295del #1	AP#187	661 ± 54
+/I295del #2	MD#18	634 ± 124
N99K/R141H	LA#29	1081 ± 79
	LA#33	1435 ± 125
+/R141H	MA#77	1160 ± 35
A195V/L197PX26	TT#178	849 ± 72
	TT#180	809 ± 60
+/A195V	PT#172	698 ± 64
	PT#176	779 ± 88
+/L197PX26	AT#166	1116 ± 34
	AT#168	960 ± 44
+/V86M #1	IS#53a	595 ± 54
+/V86M #2	JS#52a	621 ± 99

TEER: transepithelische/transendothelische elektrische Widerstand

In der ICC zeigten normale hiRPE-Zellen (+/+ #1) eine Kolokalisation von BEST1 mit β-Catenin (CTNNB1), einem Protein, das an der basolateralen Membran von polarisierten Epithelzellen zu finden ist. Die M. Best Zelllinien +/N11K, +/R218C und +/A243V (im Folgenden als M. $Best_{PM}$ bezeichnet; PM = Plasmamembran) und die beiden ADVIRC Zelllinien (+/V86M #1 und +/V86M #2) wiesen eine basolaterale Lokalisation, vergleichbar mit normalem BEST1 auf. Wohingegen +/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2 (im Folgenden als M. $Best_{IN}$ bezeichnet; IN = Intrazellulär) eine deutliche Fehllokalisation des Proteins im Zytoplasma ergaben. Sowohl in den ARB Zelllinien (N99K/R141H und A195V/L197PX26) als auch in den Zelllinien der heterozygoten ARB Eltern (+/R141H, +/A195V und +/L197PX26) war BEST1 an der basolateralen Membran präsent (**Abbildung 4**).

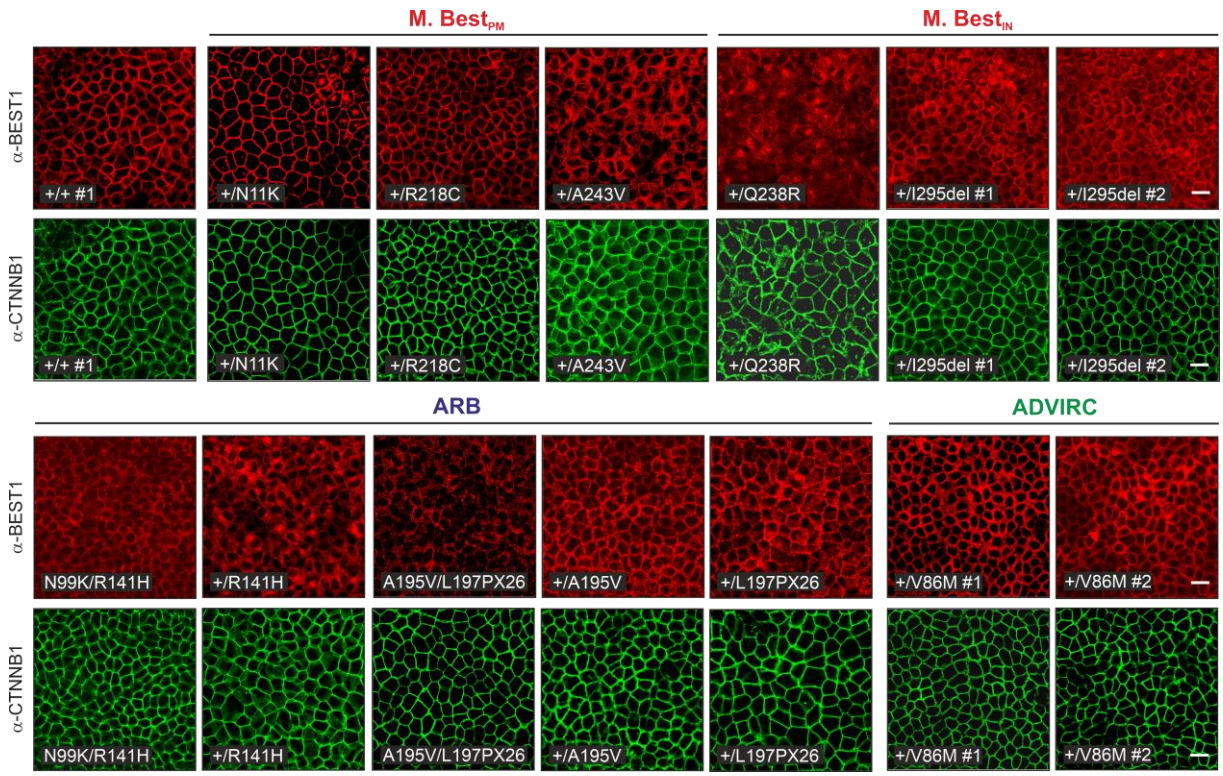


Abbildung 4: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation von BEST1 in Kontroll-, M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen von Kontroll- (+/+ #1), M. Best$_{PM}$ (+/N11K, +/R218C und +/A243V), M. Best$_{IN}$ (+/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2), ARB sowie ARB Eltern (N99K/R141H, +/R141H, A195V/L197PX26, +/A195V und +/L197PX26) und ADVIRC (+/V86M #1 und +/V86M #2) hiRPE-Zellen. Die Zellen wurden für fünf Wochen bis zum Erreichen der Polarität auf Transwell-Filtern kultiviert und anschließend gegen BEST1 (rot) und CTNNB1 (grün) gefärbt. Maßstabsleiste: 20 µm. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Der nächste Schritt umfasste die Analyse der BEST1 mRNA Expression mittels qRT-PCR. Als Kontrolle wurde *RPE65* als spezifischer Marker für differenzierte RPE-Zellen mitgeführt. Zunächst wurde die Expression von *BEST1* und *RPE65* in drei unabhängigen Kontroll-Zelllinien (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3) bestimmt. Bei beiden Markern zeigte sich eine hohe Expression mit einer geringen Variabilität zwischen den einzelnen hiRPE-Zelllinien, die aufgrund des unabhängigen Reprogrammierungs- sowie Differenzierungsprozesses entsteht (*BEST1*: 1,11 ± 0,13; 0,77 ± 0,14 und 1,09 ± 0,09; *RPE65*: 1,06 ± 0,12; 1,30 ± 0,08 und 0,77 ± 0,01) (**Abbildung 5**).

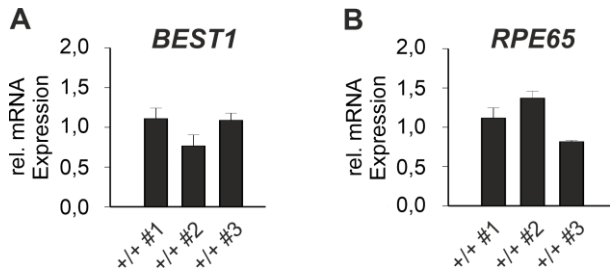


Abbildung 5: Relative mRNA Expression von (A) *BEST1* und (B) *RPE65* in Kontroll-hiRPE-Zellen. Von drei unverwandten Kontroll-Zelllinien (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3) wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels qRT-PCR analysiert. Unabhängige Proben (n = 3) wurden in Triplikaten getestet und auf die Expressionsdaten des Haushaltsgens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (*HPRT1*) normalisiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Weiterhin demonstrierten die 13 Patienten-Zelllinien eine hohe *BEST1* und *RPE65* Expression mit einer Variabilität von 0,39 ± 0,03 bis 1,51 ± 0,20 für *BEST1* bzw. 0,18 ± 0,06 bis 1,21 ± 011 für *RPE65*, welche spezifisch für die Zelllinien, jedoch nicht für den Phänotyp ist (**Abbildung** 6).

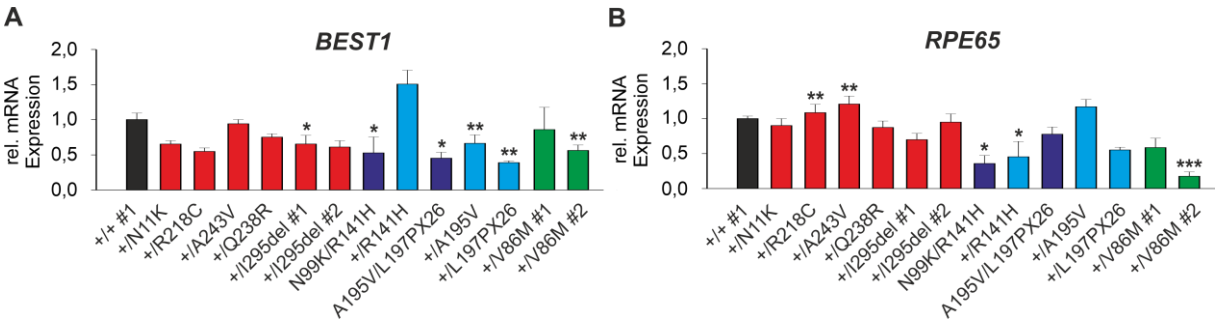


Abbildung 6: Relative mRNA Expression von (A) *BEST1* und (B) *RPE65* in M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. Von 14 hiRPE-Zelllinien (Kontrolle: +/+ #1; M. Best$_{PM}$: +/N11K, +/R218C und +/A243V; M. Best$_{IN}$: +/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2; ARB sowie ARB Eltern: N99K/R141H, +/R141H, A195V/L197PX26, +/A195V und +/L197PX26; ADVIRC: +/V86M #1 und V86M #2) wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels qRT-PCR analysiert. Unabhängige Proben (n = 3) wurden in Triplikaten getestet, auf die Expressionsdaten von *HPRT1* normalisiert und relativ zur Kontrolle angegeben. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05; ** = p < 0,01 und *** p = < 0,001 relativ zur Kontrolle (+/+ #1). Schwarz = Kontroll-Zelllinie; rot = M. Best Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien; hellblau = ARB Eltern Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Die ARB-assoziierte Mutation p.(L197PX26) resultiert in einem vorzeitigen Stopcodon. Um die Konsequenzen dieser Mutation auf die BEST1 mRNA Expression zu untersuchen, wurde mittels Sanger-Sequenzierung der Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) rs1800007 in *BEST1* Exon 2 sowohl in der gDNA als auch in der komplementären DNA (*complementary* DNA, cDNA) von der ARB Eltern Zelllinie +/L197PX26 analysiert. PCR-Amplifikation der gDNA Sequenz ergab das normale (C) und das mutierte (T) Allel. Jedoch zeigte die cDNA Sequenz nur das normale (C) Transkript, was auf ein Fehlen

des mutierten L197PX26 Transkripts schließen lässt. Vermutlich unterliegt dieses einem *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), infolgedessen kein BEST1 Protein exprimiert wird. Im Gegensatz dazu demonstrierte die Sanger-Sequenzierung des SNPs rs1800009 in *BEST1* Exon 10 in der ARB Zelllinie N99K/R141H, zusammengesetzt-heterozygot für zwei Missense-Mutationen, in der gDNA sowie in der cDNA das normale (T) und das mutierte (C) Transkript (**Abbildung 7**). In diesem Fall wird die Produktion von BEST1 Protein durch die Missense-Mutationen nicht verhindert, sondern fehlerhaftes Protein wird synthetisiert.

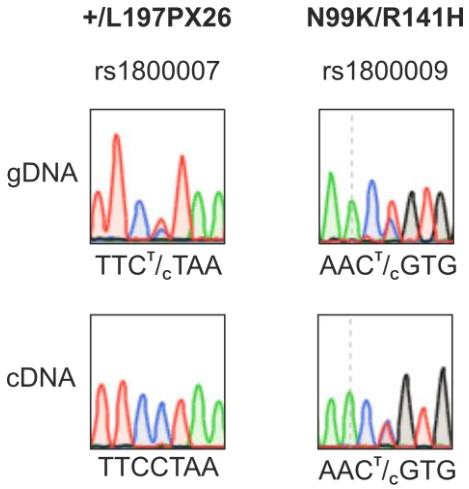


Abbildung 7: Konsequenz des vorzeitigen Stopcodons infolge der *BEST1* Mutation p.(L197PX26). Sanger-Sequenzierung der Einzelnukleotid-Polymorphismen rs1800007 in *BEST1* Exon 2 (+/L197PX26; links) und rs1800009 in *BEST1* Exon 10 (N99K/R141H; rechts) in der gDNA und cDNA der hiRPE-Zellen. NMD in +/L197PX26 wird durch die ausschließliche Detektion des normalen Transkripts (C) in der cDNA vermutet. Wohingegen Missense-Mutationen in N99K/R141H in der Identifizierung des normalen (T) und des mutierten (C) Transkripts in der gDNA sowie cDNA resultieren. Die Abbildung wurde mit SnapGene® erstellt. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Weiterhin wurde die BEST1 Proteinexpression von Ganzzell-Lysaten der 14 hiRPE-Zelllinien mittels Western Blot bestimmt und auf das Haushaltsgen β-Aktin (ACTB) desselben Blots normalisiert. Die M. Best$_{PM}$ Zelllinien +/N11K, +/R218C und +/A243V (126,80 % ± 66,85 %; 71,29 % ± 22,55 % und 249,00 % ± 48,13 %), die ADVIRC Zelllinien +/V86M #1 und +/V86M #2 (101,65 % ± 29,49 % und 69,69 % ± 23,87 %) sowie die Zelllinien der ARB Eltern +/A195V und +/L197PX26 (190,68 % ± 79,01 % und 237,03 % ± 42,55 %) zeigten eine ähnliche oder sogar höhere Proteinexpression als die Kontrolle +/+ #1 (100 %). Im Gegensatz hierzu geht die Protein-Fehllokalisation in den M. Best$_{IN}$ Zelllinien +/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2 mit einer signifikant reduzierten BEST1 Proteinexpression einher (46,89 % ± 20,67 %; 35,41 % ± 17,64 % und 28,59 % ± 10,59 %). Die ARB Eltern Zelllinie +/R141H wies im Vergleich zu den anderen beiden ARB Eltern Zelllinien +/A195V und +/L197PX26 eine geringere Proteinmenge auf (35,83 % ± 21,37 %; 190,68 % ± 79,01 % und 237,03 % ± 29,49 %). In Einklang mit dem schwachen Signal in der ICC demonstrierten die beiden ARB Zelllinien

N99K/R141H und A195V/L197PX26 eine signifikant verminderte BEST1 Proteinexpression (13,96 % ± 7,57 % und 5,47 % ± 3,37 %) (**Abbildung 8**).

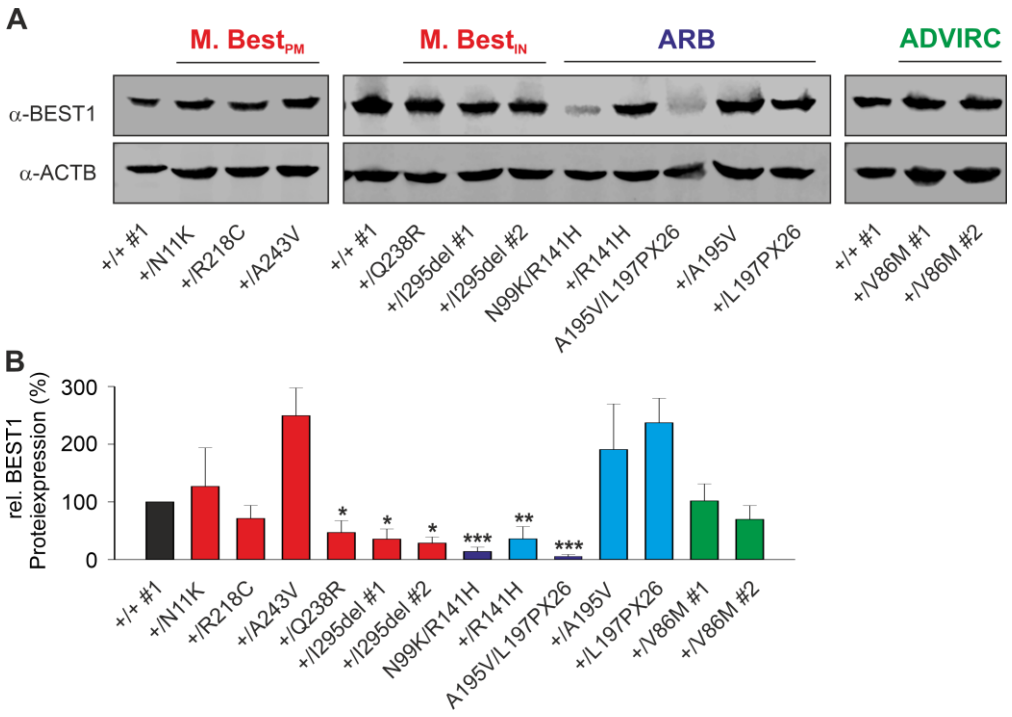


Abbildung 8: BEST1 Proteinexpression in Kontroll-, M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. (A) Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von Kontroll- (+/+ #1), M. Best$_{PM}$ (+/N11K, +/R218C und +/A243V), M. Best$_{IN}$ (+/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2), ARB sowie ARB Eltern (N99K/R141H, +/R141H, A195V/L197PX26, +/A195V und +/L197PX26) und ADVIRC (+/V86M #1 und +/V86M #2) hiRPE-Zellen mit einem Antikörper gegen humanes BEST1. Anti-ACTB diente als Ladekontrolle. **(B)** Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression aus (A). Die Werte sind normalisiert auf ACTB desselben Blots und relativ zur Kontrolle (+/+ #1) angegeben. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD von zwei technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 2 - 3). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05; ** = p < 0,01 und *** p = < 0,001 relativ zur Kontrolle (+/+ #1). Schwarz = Kontroll-Zelllinie; rot = M. Best Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien; hellblau = ARB Eltern Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Generell ist es möglich, hiRPE-Zelllinien aus Patienten zu generieren, die BEST1 sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene exprimieren, und somit ein geeignetes und stabiles *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung der Pathologie der Bestrophinopathien darstellen. Die Lokalisation bzw. die Fehllokalisation des BEST1 Proteins stellt einen ersten molekularen Mechanismus dar, mit welchem *BEST1* Mutationen differenziert werden können.

4.2.2 Einfluss von ADVIRC-assoziierten *BEST1* Mutationen auf das Spleißen der BEST1 mRNA

Frühere Experimente mit einem *in vitro* Minigen-Assay mit HEK293-Zellen deuteten darauf hin, dass die ADVIRC-assoziierten Mutationen p.(V86M), p.(Y236C) und p.(V239M) in einem alternativen BEST1 mRNA Spleißen resultieren (Yardley et al., 2004). Dagegen konnte in hiRPE-Zellen mit den Mutationen p.(V235A) (Carter et al., 2016) oder p.(G83D) (Chen et al., 2016) nur die normale Spleißvariante nachgewiesen werden. Um das mRNA Spleißen im endogenen Zellmodell für die in dieser Arbeit vorliegende Mutation p.(V86M) zu analysieren, wurde die *BEST1* cDNA voller Länge von einer Kontroll- (+/+ #1) und den beiden ADVIRC hiRPE-Zelllinien (+/V86M #1 und +/V86M #2) mittels RT-PCR amplifiziert. Auf dem Agarosegel wurde in allen Proben ausschließlich ein 1,7 kb großes Fragment detektiert, was das korrekte Spleißen von Exon 4, wo die Mutation p.(V86M) lokalisiert ist, veranschaulicht (**Abbildung 9A**). Zudem zeigte die Sanger-Sequenzierung nach PCR-Amplifikation von *BEST1* Exon 2 bis Exon 6 ein übereinstimmendes Amplikon in der Kontroll- sowie in den ADVIRC Zelllinien (**Abbildung 9B**).

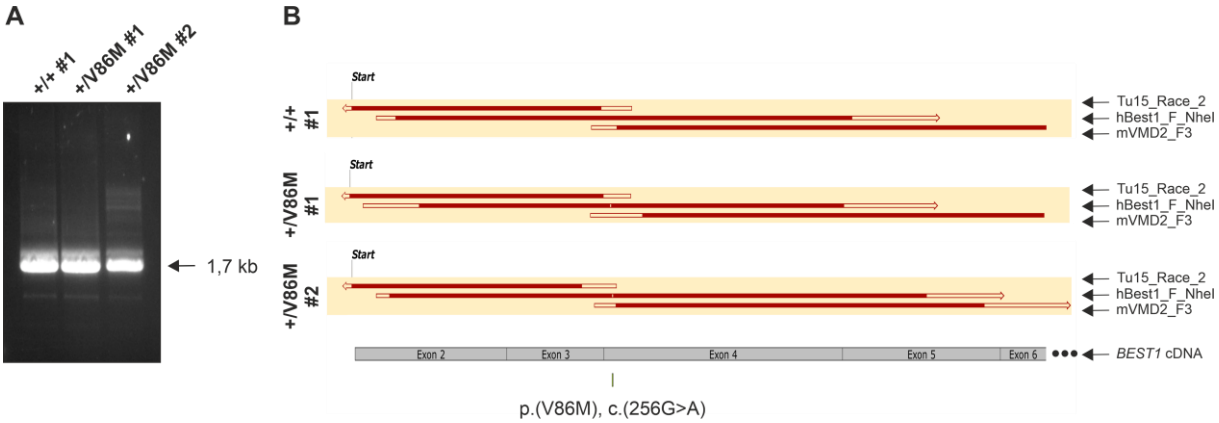


Abbildung 9: Einfluss der ADVIRC-assoziierten *BEST1* Mutation p.(V86M) in Exon 4 auf das BEST1 mRNA Spleißen. (A) Die Amplifikation von *BEST1* cDNA voller Länge von einer Kontroll- (+/+ #1) und zwei ADVIRC Zelllinien (+/V86M #1 und +/V86M #2) resultierte ausschließlich in einem 1,7 kb großen Fragment, was das korrekte Spleißen von Exon 4 veranschaulicht. **(B)** Die Sanger-Sequenzierung nach PCR-Amplifikation von *BEST1* Exon 2 bis Exon 6 einer Kontroll- (+/+ #1) und zwei ADVIRC Zelllinien (+/V86M #1 und +/V86M #2) zeigte eine übereinstimmende Sequenz. Verwendet wurden die Primer Tu15_Race_2, hBest1_F_NheI und mVMD2_F3 (**Tabelle 8**). Die Abbildung wurde mit SnapGene® erstellt. Abbildung 9A modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

4.2.3 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität in hiRPE-Zellen

BEST1 fungiert als Anionenkanal (Sun et al., 2002; Hartzell et al., 2008; Xiao et al., 2010; Marmorstein et al., 2015; Milenkovic et al., 2015), kann aber auch weitere Verbindungen und Ionen wie Bicarbonat, Bromid, Iodid, Nitrat sowie Thiocyanat transportieren (Suzuki et al., 2006). Diese Eigenschaft macht es möglich, einen fluoreszenzbasierten Assay zu entwickeln, mit dem indirekt die BEST1-Kanalfunktion untersucht werden kann. Der sogenannte Halogenidtransport-Assay wurde im Vorfeld dieser Arbeit am Institut für Humangenetik, Regenburg, etabliert und misst die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität (Galietta et al., 2001; Nachtigal et al., 2020).

Hierfür wurde mittels lentiviraler Transduktion der Biosensor $YFP_{H148Q/I152L}$ in hiRPE-Zellen eingebracht. Dieser Sensor basiert auf dem gelb-fluoreszierenden Protein YFP, das eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Iodid aufweist (Jayaraman et al., 2000). Dies bedeutet, dass in Anwesenheit von Iodid die YFP-Fluoreszenz in der Zelle reversibel gelöscht wird, wohingegen in Abwesenheit von Iodid die YFP-Fluoreszenzintensität steigt. Iodid passiert dabei im Austausch zu Chlorid die PM durch die geöffneten BEST1-Kanäle. Dabei kann sowohl der Einstrom als auch der Ausstrom der Iodid-Ionen betrachtet werden. Im Halogenidtransport-Assay mit hiRPE-Zellen wurde der Iodid-Ausstrom gemessen. Je höher und schneller hier die YFP-Fluoreszenzintensitäten steigen, desto besser ist die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität.

Zur Validierung des Halogenidtransport-Assays wurden zunächst drei unabhängige Kontroll-Zelllinien (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3) untersucht. Alle drei Zelllinien zeigten eine schnelle und steile Kinetik der zunehmenden YFP-Fluoreszenzintensitäten auf bis zu ~ 143 % (129,12 % ± 2,39 %; 122,28 % ± 1,58 % und 143,06 % ± 1,53 %) (**Abbildung 10A**). Im Gegensatz dazu war die Kinetik der YFP-Fluoreszenzintensitäten in allen M. Best- und ARB-assoziierten Zelllinien bis maximal ~ 115 % deutlich reduziert und deuten auf eine verminderte BEST1-Kanalfunktion (M. $Best_{PM}$: +/N11K: 101,81 % ± 1,17 %; +/R218C: 99,67 % ± 0,88 %; +/A243V: 106,17 % ± 1,41 % (**Abbildung 10B**); M. $Best_{IN}$: +/Q238R: 103,64 % ± 1,74 %; +/I295del #1: 100,02 % ± 1,20 %; +/I295del #2: 112,93 % ± 1,21 % (**Abbildung 10C**); ARB: N99K/R141H: 104,79 % ± 1,20 % (**Abbildung 10D**) und A195V/L197PX26: 114,05 % ± 1,09 % (**Abbildung 10E**)). Hervorzuheben sind außerdem die Ergebnisse der drei Zelllinien der gesunden ARB Eltern. Bei heterozygotem Vorliegen einer rezessiven *BEST1* Mutation war die Kinetik der ansteigenden YFP-Fluoreszenzintensitäten durchaus vergleichbar mit der der Kontroll-Zelllinien und dokumentieren somit auf molekularer Ebene, dass BEST1 Haploinsuffizienz per se keinen zellulären Phänotyp zeigt (+/R141H: 113,31 % ± 1,69 %

(**Abbildung 10D**); +/A195V: 132,80 % ± 1,60 % und +/L197PX26: 126,09 % ± 1,53 % (**Abbildung 10E**)). Interessanterweise wiesen beide ADVIRC-assoziierten Zelllinien eine Kinetik der ansteigenden der YFP-Fluoreszenzintensitäten auf bis zu ~ 153 % auf, was den Wert der Kontrollen deutlich überschreitet. Dies lässt den Schluss zu, dass ADVIRC-assoziierte, im Gegensatz zu M. Best- bzw. ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen, das Schließen des BEST1-Ionenkanals negativ beeinflussen und somit durch eine erhöhte Membranpermeabilität den für ADVIRC typischen Phänotyp verursachen (+/V86M #1: 153,01 % ± 2,56 % und +/V68M #2: 153,93 % ± 2,53 %) (**Abbildung 10F**).

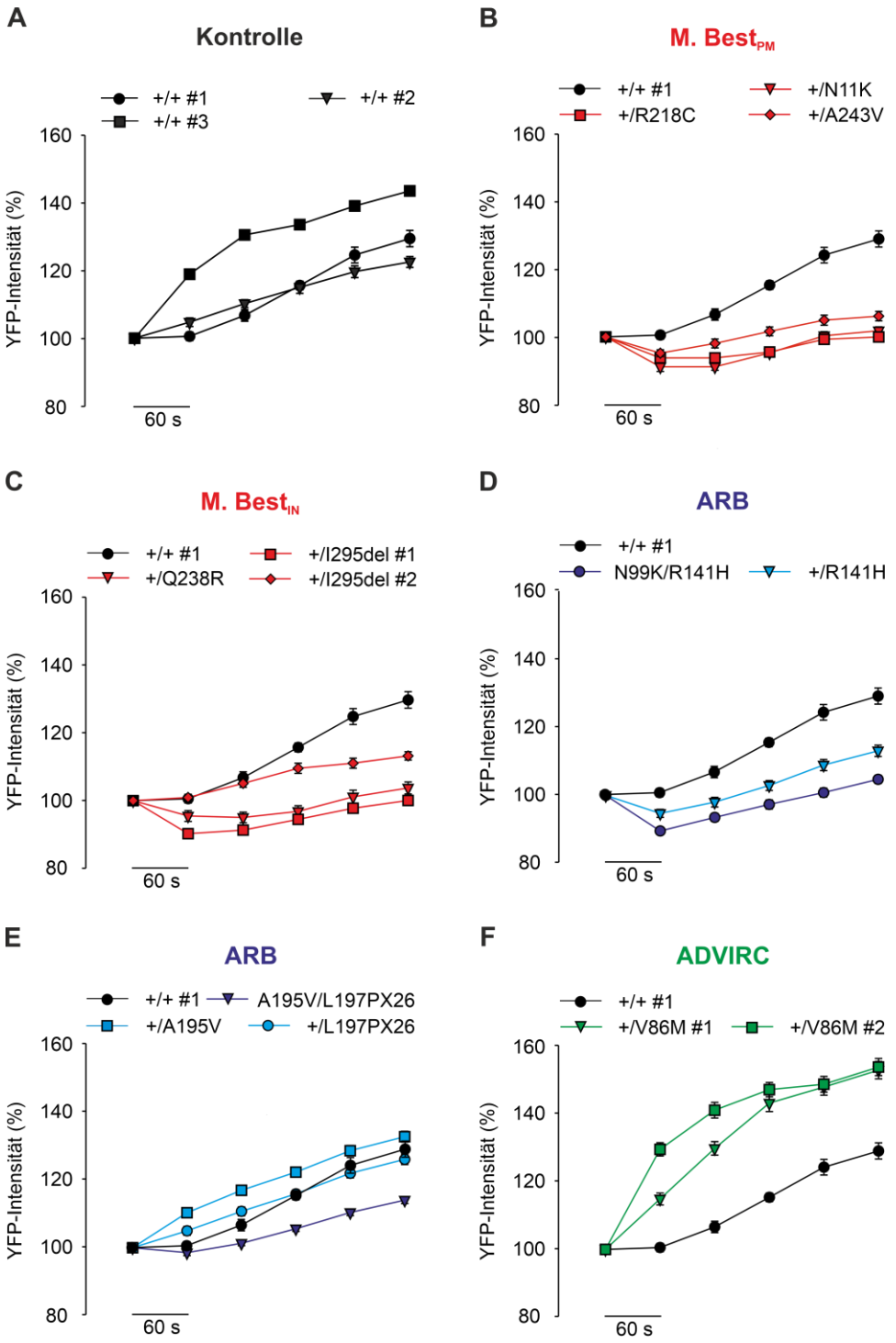


Abbildung 10: Repräsentative Kurven der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit Kontroll-, M. Best, ARB und ADVIRC hiRPE-Zellen. (A) Kontroll- (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3), **(B)** M. Best$_{PM}$ (+/N11K, +/R218C und +/A243V), **(C)** M. Best$_{IN}$ (+/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2), **(D-E)** ARB sowie ARB Eltern (N99K/R141H, +/R141H, A195V/L197PX26, +/A195V und +/L197PX26) und **(F)** ADVIRC (+/V86M #1 und +/V86M #2) hiRPE-Zellen im Halogenidtransport-Assay. Zur Messung der YFP-Fluoreszenzintensitäten wurden hiRPE-Zellen mit Natriumiodid-Lösung (100 mM Iodid) inkubiert, welche anschließend durch Natriumchlorid-Lösung ersetzt worden ist. Der Einstrom der Chlorid-Ionen und gleichzeitige Ausstrom von Iodid-Ionen bewirkte einen Anstieg der YFP-Fluoreszenzintensität, die somit ein Maß für die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität darstellt. Repräsentative Kurven sind dargestellt als Mittelwert ± SE von acht technischen Replikaten. Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien; hellblau = ARB Eltern Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Abbildung 11A zeigt die Steigungen der YFP-Fluoreszenzintensitäten aller Zelllinien eines jeden Mutationstyps zusammengefasst und demonstriert somit nochmals den Mutations-abhängigen Einfluss auf die BEST1-Kanalfunktion (Steigung*s^{-1} von Kontrolle: 0,026 ± 0,001; M. $Best_{PM}$: 0,005 ± 0,001; M. $Best_{IN}$: 0,006 ± 0,001; ARB: 0,010 ± 0,001; ARB Eltern: 0,021 ± 0,001 und ADVIRC: 0,042 ± 0,001).

Da die ADVIRC Zelllinien unerwarteterweise eine sehr viel größere Steigung und folglich eine höhere BEST1-vermittelte Membranpermeabilität als die Kontroll-Zelllinien zeigten, wurde dieses Ergebnis noch einmal in einem unabhängigen Versuchsansatz bestätigt. Hierfür wurde der Halogenidtransport-Assay mit drei Kontroll-Zelllinien (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3) und den ADVIRC Zelllinien durchgeführt. Letztere wurden aus jeweils zwei unabhängigen Differenzierungsvorgängen generiert (+/V86M #1a und +/V86M #1b sowie +/V86M #2a und +/V86M #2b). Die Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten bekräftigte das vorherige Ergebnis. Jede einzelne ADVIRC Zelllinie wies eine höhere Steigung und somit eine gesteigerte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität als die Kontroll-Zelllinien auf (Steigung*s^{-1} von Kontrollen: +/+ #1: 0,027 ± 0,002; +/+ #2: 0,019 ± 0,001 und +/+ #3: 0,033 ± 0,001; ADVIRC: +/V86M #1a: 0,043 ± 0,001; +/V86M #1b: 0,059 ± 0,001; +/V86M #2a: 0,049 ± 0,001 und +/V86M #2b: 0,053 ± 0,001) (**Abbildung 11B**).

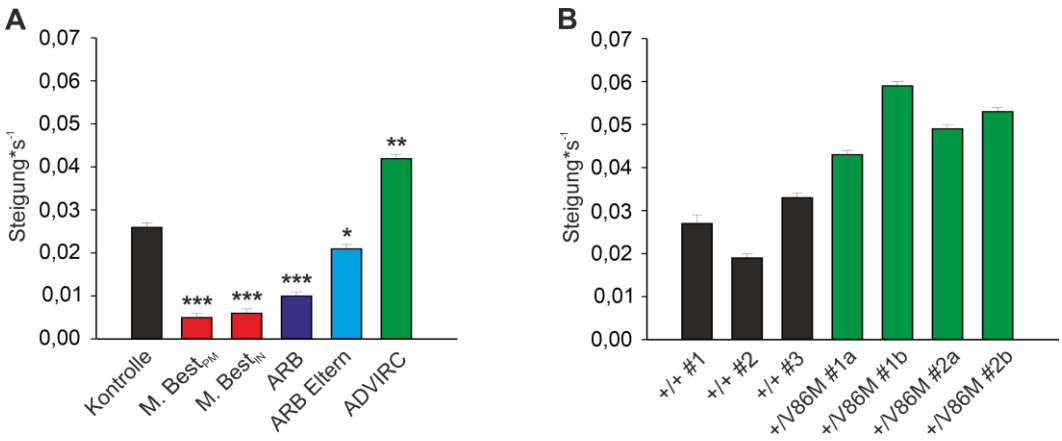


Abbildung 11: Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit Kontroll-, M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. (A) Kontroll- (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3), M. $Best_{PM}$ (+/N11K, +/R218C und +/A243V), M. $Best_{IN}$ (+/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2), ARB (N99K/R141H und A195V/L197PX26), ARB Eltern (+/R141H, +/A195V und +/L197PX26) und ADVIRC (+/V86M #1 und +/V86M #2) hiRPE-Zellen zusammengefasst aus **Abbildung 10** im Halogenidtransport-Assay sowie von **(B)** drei einzelnen Kontroll- (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3) und vier einzelnen ADVIRC (+/V86M #1a, +/V86M #1b, +/V86M #2a und +/V86M #2b) hiRPE-Zellen zur Bestätigung der Ergebnisse aus (A). Die Steigung ist angegeben als Steigung*s^{-1} von der anfangs basalen YFP-Fluoreszenz zur maximalen YFP-Fluoreszenzintensität nach 6 min Inkubation mit Natriumchlorid-Lösung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SE von sechs bis 18 technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 3 - 4). Die statistische Analyse wurde für (A) unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ und *** $p = < 0,001$ relativ zur Kontrolle (+/+ #1, +/+ #2 und +/+ #3). Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien; hellblau = ARB Eltern Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien. Abbildung 11A modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität durch M. Best- und ARB-assoziierte Mutationen erheblich reduziert wird, wohingegen ADVIRC-assoziierte Mutationen den erhöhten Transport von Anionen begünstigt. Die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität stellt somit einen wichtigen molekularen Mechanismus dar – insbesondere zur Differenzierung der autosomal dominanten Krankheitsbilder M. Best und ADVIRC.

4.2.4 Analyse der Degradationswege von fehlerhaftem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen

In der Studie von Milenkovic et al. (2018) konnte in transfizierten MDCKII-Zellen, die verschiedene BEST1 Varianten stabil exprimieren, gezeigt werden, dass der Abbau von autosomal dominantem bzw. autosomal rezessivem BEST1 Protein in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle erfolgt. Analog zu diesen Untersuchungen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Degradationswege in Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zellen ermittelt werden, die endogen BEST1 Protein exprimieren und somit ein physiologisches Zellmodell darstellen.

Für die Route der Degradation von fehlerhaftem BEST1 spielt die Stabilität des Proteins eine wichtige Rolle. Deshalb wurde in einem ersten Schritt die BEST1 Proteinstabilität in den M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zelllinien analysiert. Hierzu wurden hiRPE-Zellen 12 h mit CHX (20 µg/ml), einem bekannten Inhibitor der Proteinbiosynthese, inkubiert und anschließend die verbleibende BEST1 Proteinmenge mittels Western Blot bestimmt. In der Kontroll-Zelllinie +/+ #1 war das BEST1 Protein über 12 h stabil (**Abbildung 12A**), wohingegen die M. Best$_{IN}$ und in noch stärkerem Maße die ARB Zelllinien eine signifikante Reduktion der Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten Probe zeigten (M. Best$_{IN}$: 23,25 % ± 10,40 % und ARB: 10,11 % ± 5,23 %; Werte „kein Inhibitor“ in **Abbildung 12D** und **Abbildung 12F**) (repräsentative Western Blots in **Abbildung 12A** und **Abbildung 12B**). Dagegen wiesen die M. Best$_{PM}$ und ADVIRC Zelllinien eine nur leicht reduzierte Proteinmenge auf (M. Best$_{PM}$: 64,84 % ± 29,18 % und ADVIRC: 54,45 % ± 17,24 %; Werte „kein Inhibitor“ in **Abbildung 12C** und **Abbildung 12E**) (repräsentative Western Blots in **Abbildung 12A**). Offenbar geht eine BEST1 Lokalisation an der PM mit einer erhöhten Proteinstabilität und eine intrazelluläre Verteilung mit einem schnelleren Proteinabbau einher.

Die Degradation von Proteinen wird in der Zelle primär von zwei Mechanismen kontrolliert und reguliert. Wird Protein direkt nach der Synthese am endoplasmatischen Retikulum (ER) als fehlerhaft erkannt, wird dieses über die Proteasomen abgebaut (ER-assoziierte Degradation, *endoplasmic reticulum-associated degradation*, ERAD) (Sun und Brodsky, 2018). Es kann

jedoch auch vorkommen, dass fehlerhaftes Protein diesem ersten Qualitätskontrollmechanismus der Zelle entkommt, intrazellulär aggregiert und von den Lysosomen degradiert wird (post-ER Degradation) (Wang und Robbins, 2014).

Zur Bestimmung des Abbauweges wurden hiRPE-Zellen für 12 h mit CHX (20 µg/ml) sowie mit spezifischen Inhibitoren behandelt. Zum Einsatz kamen MG132 (40 µM), was den Abbau in den Proteasomen verhindert, und die schwache Base CQ (100 µM), welche die Lysosomen hemmt. Anschließend wurde die verbleibende BEST1 Proteinmenge mittels Western Blot analysiert.

Die Quantifizierung demonstrierte, dass die Degradation von BEST1 Protein in den M. $Best_{IN}$ Zelllinien signifikant von dem lysosomalen Inhibitor CQ inhibiert wird (CHX vs. CQ: 23,29 % ± 10,40 % vs. 106,86 % ± 45,09 %) (**Abbildung 12D**) (repräsentative Western Blots in **Abbildung 12A**). Im Gegensatz dazu wies MG132 einen signifikant starken Effekt auf fehlerhaftes Protein in den ARB Zelllinien vor (CHX vs. MG132: 10,11 % ± 5,23 % vs. 33,43 % ± 12,05 %) (**Abbildung 12F**) (repräsentative Western Blots in **Abbildung 12B**). Da BEST1 Protein in den M. $Best_{PM}$ und ADVIRC Zelllinien über die Inkubationszeit von 12 h stabil blieb, konnte hier nicht zwischen den Degradationswegen unterschieden werden (CHX: 64,84 % ± 29,18 % und 54,45 % ± 17,24 %) (**Abbildung 12C** und **Abbildung 12E**) (repräsentative Western Blots in **Abbildung 12A**).

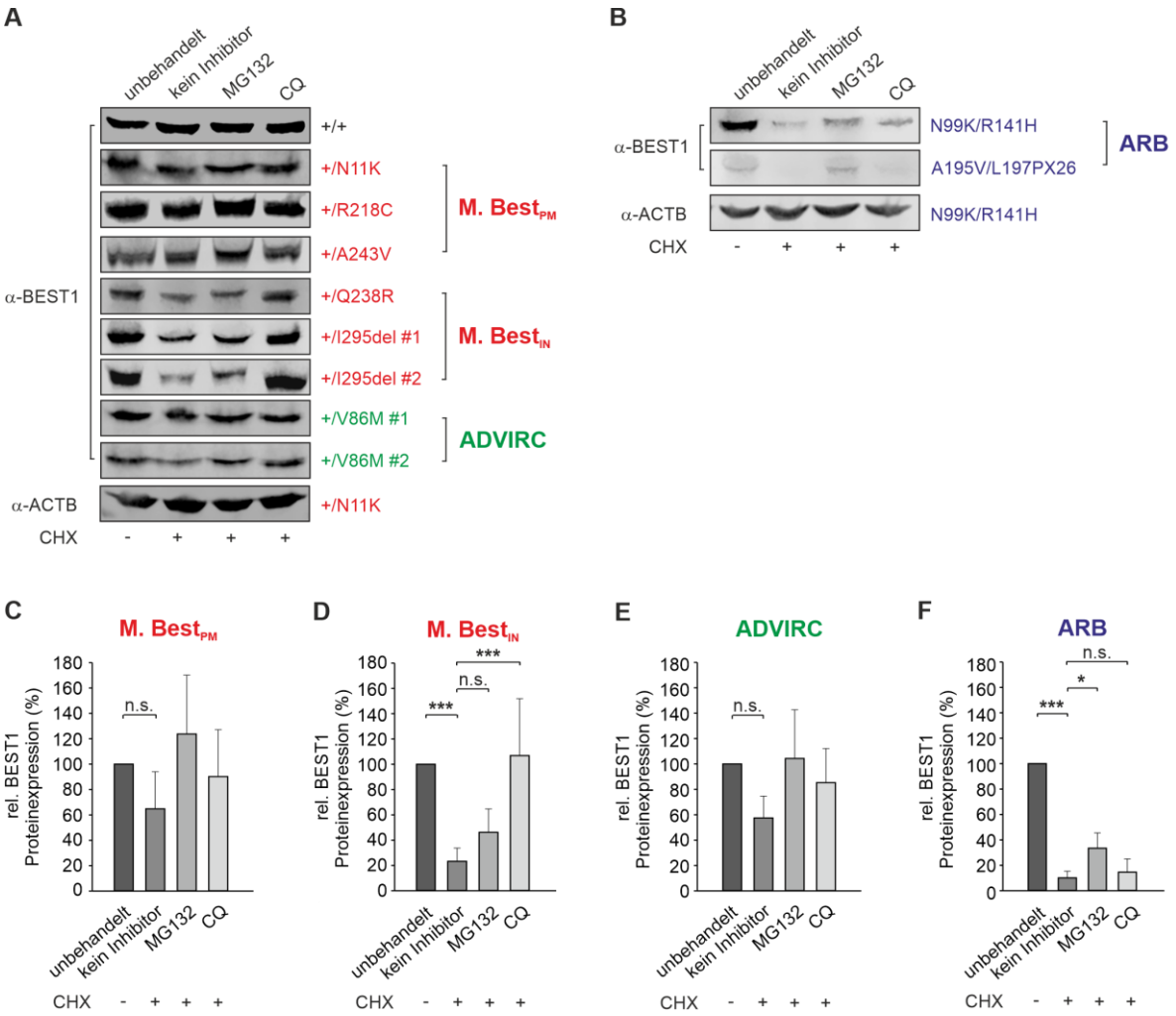


Abbildung 12: Degradationsweg von fehlerhaftem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von einzelnen **(A)** Kontroll- (+/+ #1), M. Best$_{PM}$ (+/N11K, +/R218C und +/A243V), M. Best$_{IN}$ (+/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2) und ADVIRC (+/V86M #1 und +/V86M #2) sowie **(B)** ARB (N99K/R141H und A195V/L197PX26) hiRPE-Zelllinien nach Inkubation für 12 h mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (40 µM) oder dem lysosomalen Inhibitor CQ (100 µM) in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von CHX (20 µg/ml). Die Immunfärbung wurde mit einem Antikörper gegen humanes BEST1 durchgeführt. Anti-ACTB diente als Ladekontrolle. Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression zusammengefasst aus (A) und (B) für **(C)** M. Best$_{PM}$, **(D)** M. Best$_{IN}$, **(E)** ADVIRC und **(F)** ARB hiRPE-Zelllinien. Die Werte sind normalisiert auf ACTB desselben Blots und relativ zur unbehandelten Probe angegeben. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD von zwei technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 13). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** $p = < 0,001$ und n.s. = nicht signifikant. Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass nur in ARB-assoziierten hiRPE-Zellen fehlerhaftes BEST1 Protein durch den frühen Qualitätskontrollmechanismus am ER erkannt und anschließend im Proteasom der Zelle abgebaut wird. Dagegen entkommen fehllokalisierte BEST1 Proteinkomplexe in den M. Best-assoziierten hiRPE-Zellen dem ER-Qualitätskontrollmechanismus und werden letztendlich in den Lysosomen abgebaut. Diese Ergebnisse stehen mit den früheren Resultaten von Milenkovic et al. (2018) in Einklang.

Der Proteinabbauweg stellt somit ein wichtiges Kriterium dar, womit auf molekularer Ebene eindeutig zwischen autosomal dominant und autosomal rezessiv vererbten *BEST1* Mutationen differenziert werden kann.

4.2.5 Einfluss von M. Best, ADVIRC und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die lysosomale Homöostase in hiRPE-Zellen

Anschließend wurde untersucht, ob die gesteigerte lysosomale Degradation von fehllokalisiertem autosomal dominantem BEST1 Protein einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Lysosomen hat, welche ihr Optimum in einem sauren pH-Bereich besitzen. Daher wurde zunächst der pH_{Lys}-Wert betrachtet. Die Messung wurde in den Kontroll- (+/+ #1 und +/+ #2), den M. $Best_{IN}$ (+/Q238R und +/I295del #1) und den ARB Zelllinien (N99K/R141H und A195V/L197PX26) mit Hilfe des kommerziell erwerblichen ratiometrischen Indikator-Farbstoffes LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160 durchgeführt (Hurwitz et al., 1997; Liu et al., 2008; DePedro und Urayama, 2009).

Nach einer zweiwöchigen Kultivierung der hiRPE-Zellen auf schwarzen 96-Well-Mikrotiter-Platten konnte zunächst kein Unterschied in den pH_{Lys}-Werten zwischen den Kontroll- und den M. $Best_{IN}$ Zelllinien detektiert werden. Die ARB Zelllinien zeigten im Vergleich niedrigere Werte (Kontrolle: 4,25 ± 0,02; M. $Best_{IN}$: 4,23 ± 0,03 und ARB: 4,15 ± 0,05) (**Abbildung 13A**).

Im nächsten Schritt wurden die hiRPE-Zellen vorkonditioniert. Dafür wurden die Zelllinien vor den pH-Messungen über einen Zeitraum von zwei Wochen täglich für 2 h mit POS (~ 20 POS/Zelle) inkubiert, um physiologisch lysosomalen Stress auszulösen. Dieser Stressor wurde gewählt, da die tägliche Degradation von POS eine der Hauptaufgaben des RPEs darstellt (Strauss, 2005). Nach Vorkonditionierung der hiRPE-Zellen verschob sich der pH_{Lys}-Wert der Kontroll- und der ARB Zelllinien ins saure Milieu, was auf eine Aktivierung der lysosomalen Enzyme schließen lässt. Der pH_{Lys}-Wert der M. $Best_{IN}$ Zelllinien sank zwar auch, jedoch nicht um das gleiche Maß wie die Werte der Kontroll-Zelllinien, wodurch sich nun ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und den M. $Best_{IN}$ Zelllinien ergab (Kontrolle: 3,93 ± 0,06; M. $Best_{IN}$: 4,01 ± 0,01 und ARB: 3,92 ± 0,04) (**Abbildung 13B**).

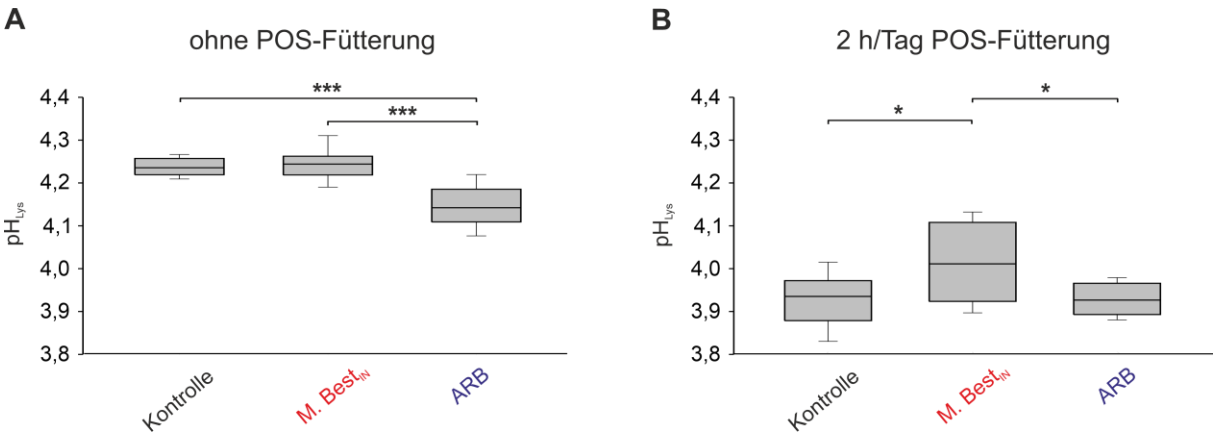


Abbildung 13: Einfluss von M. Best$_{IN}$- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf den pH$_{Lys}$-Wert in hiRPE-Zellen. Kontroll- (+/+ #1 und +/+ #2), M. Best$_{IN}$ (+/Q238R und +/I295del #1) sowie ARB (N99K/R141H und A195V/L197PX26) hiRPE-Zellen wurden zwei Wochen auf schwarzen 96-Well-Mikrotiter-Platten **(A)** ohne POS-Fütterung oder **(B)** mit einer POS-Fütterung täglich für 2 h (~ 20 POS/Zelle) kultiviert. Die Messung der pH$_{Lys}$-Werte erfolgte mittels des ratiometrischen Indikator-Farbstoffes LysoSensor^{TM} Yellow-Blue DND-160. Die absoluten pH$_{Lys}$-Werte wurden relativ zu einer Standardkurve individuell für jede Zelllinie berechnet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD von fünf technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 2). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05 und *** p = < 0,001. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Da der pH$_{Lys}$ eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von lysosomalen Enzymen spielt (Liu et al., 2008), wurde anschließend die Reifung der lysosomalen Protease CTSD untersucht (Turk et al., 1999). CTSD wird im ER als eine inaktive und kurzlebige pro-Form (proCTSD; ~ 55 kDa) synthetisiert und nach einigen Reifeschritten unter saurem pH-Wert zu einem reifen und aktiven Enzym prozessiert, das aus zwei Fragmenten unterschiedlicher Masse besteht (matCTSD; ~ 34 kDa und ~ 14 kDa) (Gieselmann et al., 1985).

Zur Vorkonditionierung wurden für diese Versuche zwei verschiedenen Stressoren gewählt. Zunächst wurden alle Zelllinien für die Induktion von lysosomalen Stress mit der schwachen Base CQ (100 µM) für 12 h inkubiert, um anschließend die verschiedenen Reifungsstufen von CTSD in Ganzzell-Lysaten mittels Western Blot nachzuweisen. Dabei zeigten alle autosomal dominant-assoziierten Zelllinien (M. Best$_{PM}$: +/N11K, +/A243V, +/R218C; M. Best$_{IN}$: +/Q238R, +/I295del #1, +/I295del #2 und ADVIRC: +/V86M #1, +/V86M #2) die pro-Form sowie die beiden reifen Formen von CTSD. Dagegen fehlte ausschließlich bei den ARB Zelllinien die ~ 55 kDa pro-Form – hier waren nur die beiden reifen Formen von CTSD detektierbar. Interessanterweise konnte die pro-Form des Enzyms auch in den Kontroll- (+/+ #1) und den ARB Eltern Zelllinien (+/R141H, +/L197PX26 und +/A195V) detektiert werden, was darauf hinweist, dass die Degradation von normalem BEST1 Protein im Zuge des Membranproteinumsatzes in den Lysosomen stattfindet. Dies wurde bereits für einige Plasmamembranproteine beschrieben (Duncan et al., 2006; Varghese et al., 2008) (**Abbildung 14A**).

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde analog zu den Versuchen zur Messung des pH_{Lys}-Wertes die POS-Fütterung als physiologischer Stressor angewandt. Kontroll- (+/+ #1), M. $Best_{IN}$ (+/Q238R und +/I295del #2) und ARB Zelllinien (N99K/R141H und A195V/L197PX26) wurden dafür eine Woche täglich für 2 h oder 24 h mit POS (~ 20 POS/Zelle) gefüttert und anschließend die verschiedenen Reifungsstufen von CTSD in Ganzzell-Lysaten mittels Western Blot nachgewiesen. Zwar ist der Effekt sehr viel schwächer (daher wurde die proCTSD-Färbung überexponiert, „proCTSD (bearbeitet)“ in **Abbildung** 14**B**), jedoch war auch hier nur in den Kontroll- und den M. $Best_{IN}$ Zellen die ~ 55 kDa pro-Form von CTSD erkennbar – nicht aber in den ARB Zellen (**Abbildung 14B**).

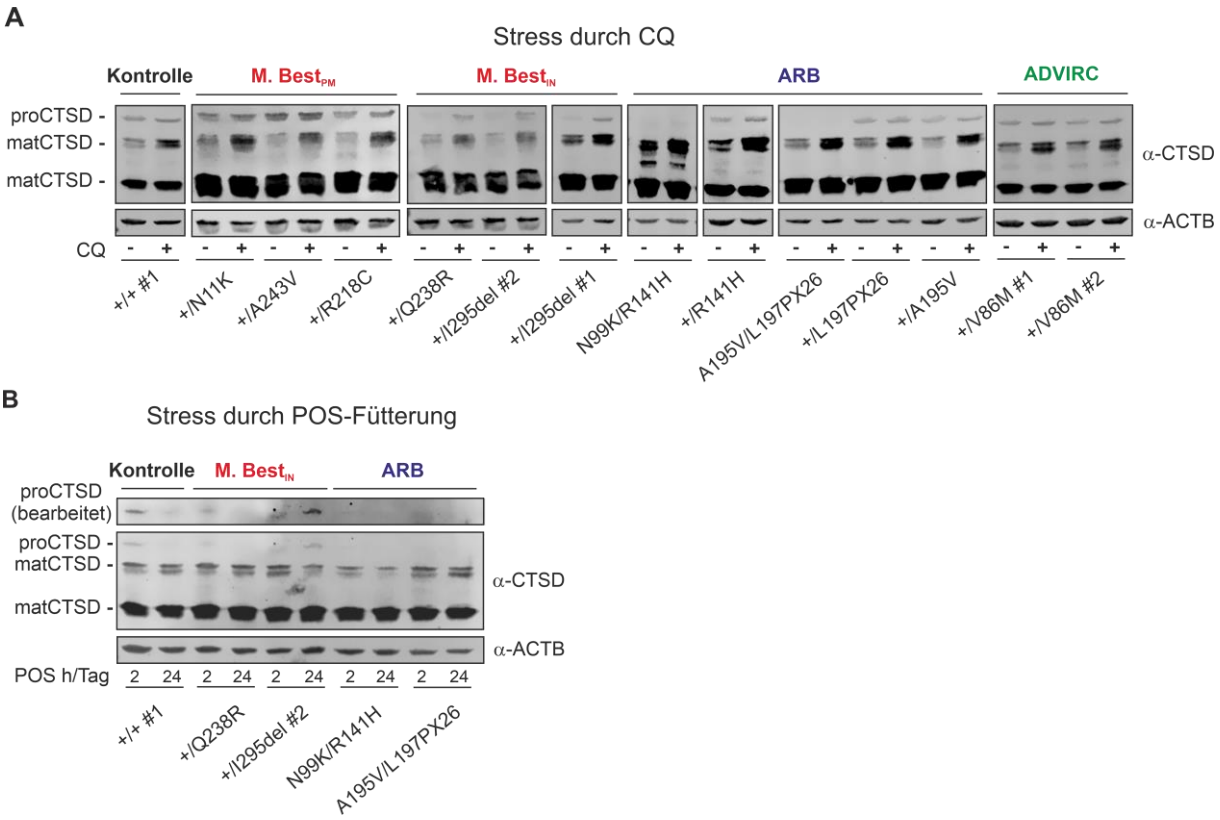


Abbildung 14: Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die Reifung des lysosomalen Enzyms CTSD in hiRPE-Zellen. Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten einzelner Kontroll- (+/+ #1), M. $Best_{PM}$ (+/N11K, +/R218C und +/A243V), M. $Best_{IN}$ (+/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2), ARB sowie ARB Eltern (N99K/R141H, +/R141H, A195V/L197PX26, +/A195V und +/L197PX26) und ADVIRC (+/V86M #1 und +/V86M #2) Zelllinien **(A)** ohne (-) oder mit (+) Inkubation von CQ (100 µM) für 12 h und **(B)** nach zwei Woche POS-Fütterung täglich für 2 h oder 24 h (~ 20 POS/Zelle). Mit einem Antikörper gegen CTSD konnten eine inaktive kurzlebige pro-Form (proCTSD; ~ 55 kDa) und zwei reife aktive Formen (matCTSD; ~ 34 kDa und ~ 14 kDa) detektiert werden. Der Bildausschnitt in (B) „proCTSD (bearbeitet)“ ist überexponiert worden, um die Abwesenheit der ~ 55 kDa Bande in den ARB Zellen zu demonstrieren. Anti-ACTB diente als Ladekontrolle. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Grundsätzlich deuten die Resultate in hohem Maße darauf hin, dass die Degradation von autosomal dominanten BEST1 Protein sowohl in M. Best als auch in ADVIRC Zelllinien die Integrität der Lysosomen beeinträchtigt.

4.3 MDCKII-Zelllinien als *in vitro* Modell zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien

MDCKII-Zellen, die ihren Ursprung in caninen Epithelzellen der Niere haben, sind polarisierbar, leicht zu manipulieren und kultivieren und stellen ein geeignetes *in vitro* Zellsystem zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien dar.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sechs stabile MDCKII-Zelllinien mittels der Grenzverdünnungsklonierungs-Strategie generiert. Darunter befanden sich vier Linien, die ADVIRC-assoziierte Varianten ($V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADIVRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$) und zwei Linien, die M. Best-assoziierte Varianten ($V235M_{M.\ Best}$ und $A243V_{M.\ Best}$) exprimieren. Die ADVIRC MDCKII-Zelllinien bilden ein besonders interessantes Modellsystem, da durch dieses ermöglicht wird, neben der p.(V86M) Mutation, die in hiRPE-Zelllinien analysiert werden konnte, weitere ADVIRC-assoziierte Varianten strukturell und funktionell zu charakterisieren. Darüber hinaus wurden in die Untersuchungen zwei ARB-assoziierte Varianten ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$) und für den Halogenidtransport-Assay zusätzlich zwei M. Best-assoziierte Varianten ($L224M_{M.\ Best}$ und $Y227N_{M.\ Best}$) einbezogen, welche bereits am Institut für Humangenetik, Regensburg, als stabile Zelllinien vorlagen. Die MDCKII-Zelllinien wurden analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit den hiRPE-Zelllinien hinsichtlich der Lokalisation, RNA- und Proteinexpression, der Membranpermeabilität, der Stabilität sowie des Degradationsweges von BEST1 untersucht.

4.3.1 Charakterisierung von M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen bezüglich der BEST1 Lokalisation, RNA- und Proteinexpression

Zunächst wurde mittels Sanger-Sequenzierung nach PCR-Amplifikation der cDNA verifiziert, dass die neu generierten MDCKII-Zelllinien die korrekte BEST1 Varianten in Exon 4 ($V86M_{ADVIRC}$) (**Abbildung 15A**), Exon 6 ($V235M_{M.\ Best}$, $V235A_{ADVIRC}$ und $Y236C_{ADVIRC}$) bzw. Exon 7 ($V239M_{ADVIRC}$ und $A243V_{M.\ Best}$) exprimieren (**Abbildung 15B**).

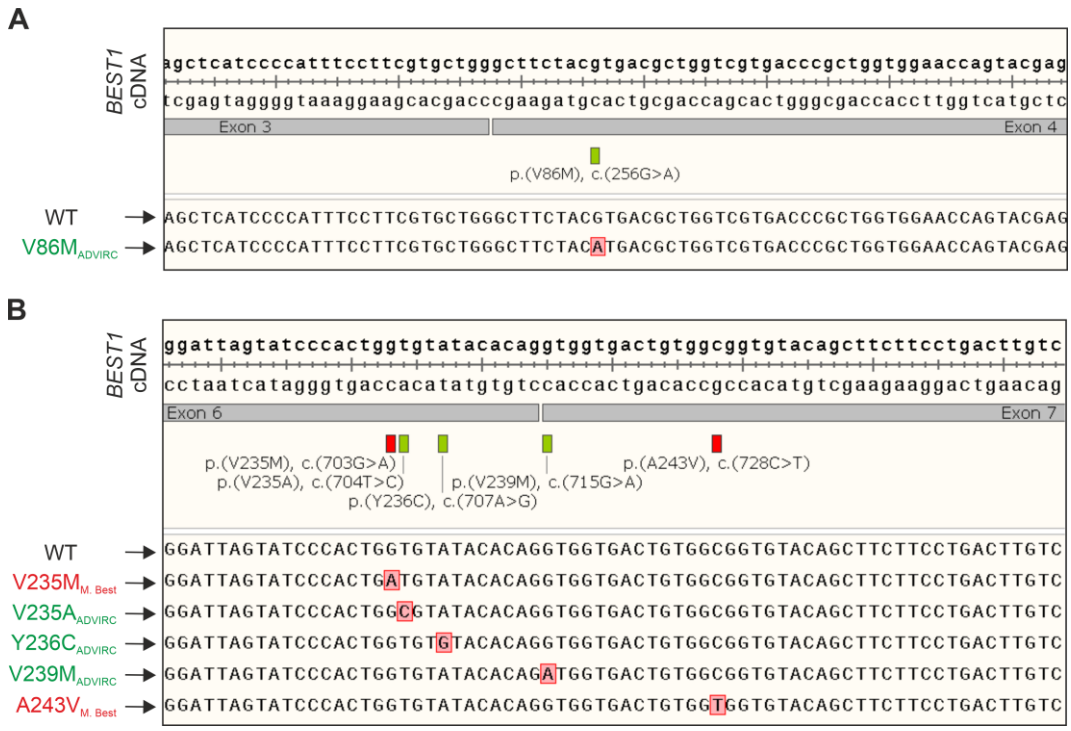


Abbildung 15: Alignment der Sanger-Sequenzierungen nach PCR-Amplifikation der *BEST1* cDNA der neu generierten M. Best und ADVIRC MDCKII-Zelllinien. MDCKII-Zellen exprimieren die Varianten **(A)** V86M$_{ADVIRC}$ in Exon 4 sowie **(B)** V235M$_{M. Best}$, V235A$_{ADVIRC}$ oder Y236C$_{ADVIRC}$ in Exon 6 bzw. A243V$_{M. Best}$ oder V239M$_{ADVIRC}$ in Exon 7. Zur Verifizierung der korrekten BEST1 Variante wurden die Primer (A) Tu15_NEW_R1 und (B) Tu15_NEW_R2 verwendet (**Tabelle 8**). Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien. Die Abbildung wurde mit SnapGene® erstellt.

Im nächsten Schritt wurden die sechs neu generierten ADVIRC sowie die M. Best und die zwei bereits vorhandenen ARB MDCKII-Zelllinien hinsichtlich ihrer BEST1 Lokalisation, RNA- und Proteinexpression untersucht.

Die polarisierten MDCKII-Zellen wurden analog zu den Experimenten mit hiRPE-Zellen immunzytochemisch gefärbt und an einem konfokalen Mikroskop analysiert (**Abschnitt 4.2.1**). Erwartungsgemäß zeigte wildtypisches (WT) BEST1 eine ausgeprägte Kolokalisation mit dem PM Marker CTNNB1. Eine ähnlich starke PM-Lokalisation war auch bei der M. Best-assoziierten (V235M$_{M. Best}$) und den vier ADVIRC-assoziierten Varianten (V86M$_{ADVIRC}$, V235A$_{ADVIRC}$, Y236C$_{ADVIRC}$ und V239M$_{ADVIRC}$) zu beobachten. Demgegenüber wurde BEST1 in der A243V$_{M. Best}$ Zelllinie vorwiegend im Zytoplasma detektiert. Wie bereits in der Studie von Milenkovic et al. (2018) beschrieben, wiesen die beiden ARB-assoziierten Varianten (R141H$_{ARB}$ und A195V$_{ARB}$) ein schwächeres Fluoreszenzsignal auf, das sich primär an der basolateralen Membran befindet (**Abbildung 16**).

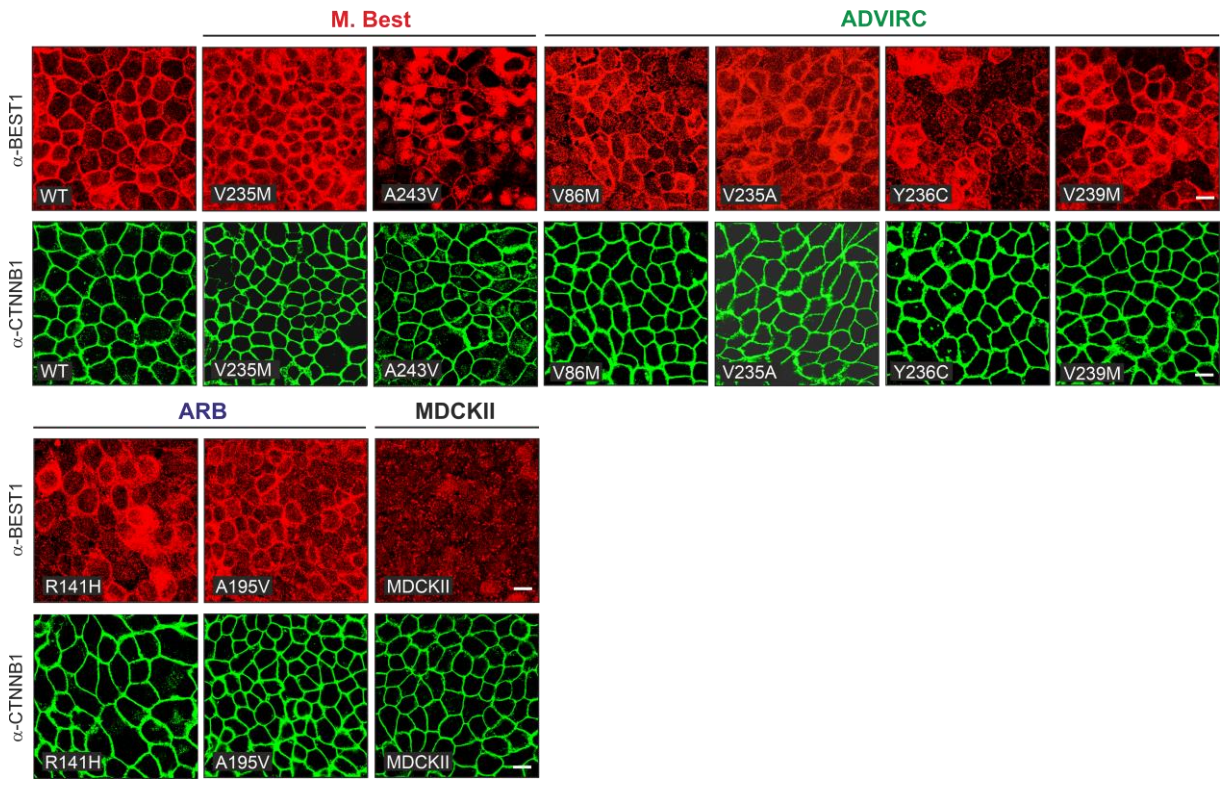


Abbildung 16: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation von BEST1 in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. Immunzytochemische Färbung von MDCKII-Zelllinien, die WT BEST1 oder M. Best- ($V235M_{M.\ Best}$ und $A243V_{M.\ Best}$), ADVIRC- ($V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$) bzw. ARB- ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$) assoziierte BEST1 Varianten exprimieren. Untransfizierte MDCKII-Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden für fünf Tage bis zum Erreichen der Polarität auf Deckgläschen kultiviert und mit einem Antikörper gegen humanes BEST1 (rot) und CTNNB1 (grün) gefärbt. Maßstabsleiste: 20 µm.

Sowohl die qualitative RNA- als auch Proteinexpression zeigten, dass alle Zelllinien BEST1 exprimieren. Dagegen konnte in untransfizierten MDCKII-Zellen weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene BEST1 detektiert werden (**Abbildung 17**).

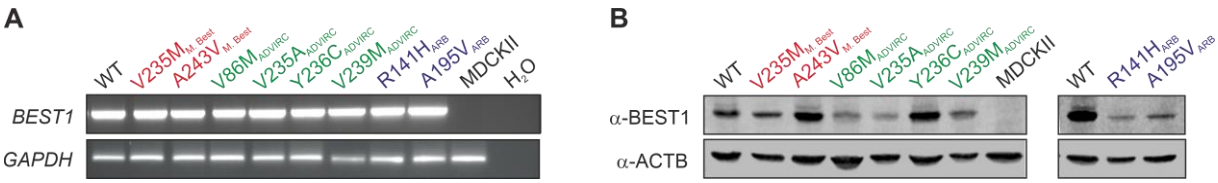


Abbildung 17: Qualitative RNA- und Proteinexpression in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. (A) Von MDCKII-Zellen, die WT BEST1 oder M. Best- ($V235M_{M.\ Best}$ und $A243V_{M.\ Best}$), ADVIRC- ($V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$) bzw. ARB- ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$) assoziierte Varianten exprimieren wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels semi-quantitativer RT-PCR die BEST1 mRNA Expression analysiert. Untransfizierte MDCKII-Zellen dienten als Kontrolle und *GAPDH* als Ladekontrolle. **(B)** Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von MDCKII-Zellen, die WT BEST1 oder M. Best- ($V235M_{M.\ Best}$ und $A243V_{M.\ Best}$), ADVIRC- ($V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$) bzw. ARB- ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$) assoziierte BEST1 Varianten exprimieren mit einem Antikörper gegen humanes BEST1. Untransfizierte MDCKII-Zellen dienten als Kontrolle und Anti-ACTB als Ladekontrolle. Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien.

4.3.2 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität in MDCKII-Zellen

Zur funktionellen Analyse der BEST1-vermittelten Membranpermeabilität in den MDCKII-Zelllinien wurde analog zu den Experimenten mit den hiRPE-Zellen der Biosensor $YFP_{H148Q/I152L}$ koexprimiert (**Abschnitt 4.2.3**). Lediglich wurde in MDCKII-Zellen anstelle des Iodid-Ausstroms, der Iodid-Einstrom durch die BEST1-Kanäle gemessen. Folglich ist die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität höher, desto schneller und stärker die YFP-Fluoreszenzintensitäten abnehmen.

Für die WT Zelllinie war eine schnelle Kinetik der abnehmenden YFP-Fluoreszenzintensitäten auf ~ 40 % zu beobachten, während für die M. Best und ARB MDCKII-Zelllinien kaum eine Abnahme zu erkennen war (WT: 37,61 % ± 4,20 %; M. Best: $L224M_{M.\ Best}$: 75,02 % ± 0,72 %; $Y227N_{M.\ Best}$: 72,23 % ± 0,47 %; $V235M_{M.\ Best}$: 80,12 % ± 2,55 % und $A243V_{M.\ Best}$: 60,33 % ± 1,07 %; ARB: $R141H_{ARB}$: 70,51 % ± 0,95 % und $A195V_{ARB}$: 64,92 % ± 2,0 %) (**Abbildung 18A** und **Abbildung 18C**). Im Gegensatz dazu war die Kinetik der YFP-Fluoreszenzintensitäten in den ADVIRC Zelllinien mit Werten von ~ 60 % bis 48 % denen der WT Zelllinie ähnlich ($V86M_{ADVIRC}$: 49,51 % ± 0,85 %; $V235A_{ADVIRC}$: 60,01 % ± 1,31 %; $Y236C_{ADVIRC}$: 54,10 % ± 0,98 % und $V239M_{ADVIRC}$: 48,43 % ±1,35 %) (**Abbildung 18B**). Die Ergebnisse verdeutlichten für M. Best und ARB MDCKII-Zelllinien im Vergleich zu WT und ADVIRC MDCKII-Zelllinien eine verminderte BEST1-Kanalfunktion.

Die Berechnung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zelllinien bestätigte diesen Eindruck. Die Kinetik der abnehmenden YFP-Fluoreszenzintensitäten war in den M. Best und ARB Zelllinien signifikant geringer im Vergleich zum WT (Steigung*s^{-1} von WT: -0,19 ± 0,007; M. Best: $L224M_{M.\ Best}$: -0,11 ± 0,005; $Y227N_{M.\ Best}$: -0,09 ± 0,006; $V235M_{M.\ Best}$: -0,08 ± 0,005 und $A243V_{M.\ Best}$: -0,13 ± 0,005 %; ARB: $R141H_{ARB}$: -0,09 ± 0,002 und $A195V_{ARB}$: -0,10 ± 0,004). Wohingegen die ADVIRC Zelllinien keinen Unterschied zum WT aufzeigten. Lediglich die ADVIRC-assoziierte Variante $Y236C_{ADVIRC}$ bildete eine Ausnahme (Steigung*s^{-1} von ADVIRC: $V86M_{ADVIRC}$: -0,15 ± 0,007; $V235A_{ADVIRC}$: -0,14 ± 0,007; $Y236C_{ADVIRC}$: -0,12 ± 0,008 und $V239M_{ADVIRC}$: -0,15 ± 0,004) (**Abbildung 18D**).

Die Zusammenfassung der Steigungen der YFP-Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zelllinien dokumentierte sowohl in M. Best und ARB als auch in ADVIRC Zelllinien eine signifikant größere Steigung im Vergleich zu WT (Steigung*s^{-1} von WT: -0,19 ± 0,007; M. Best: -0,10 ± 0,004; ADVIRC: -0,14 ± 0,004 und ARB: -0,09 ± 0,002) (**Abbildung 18E**).

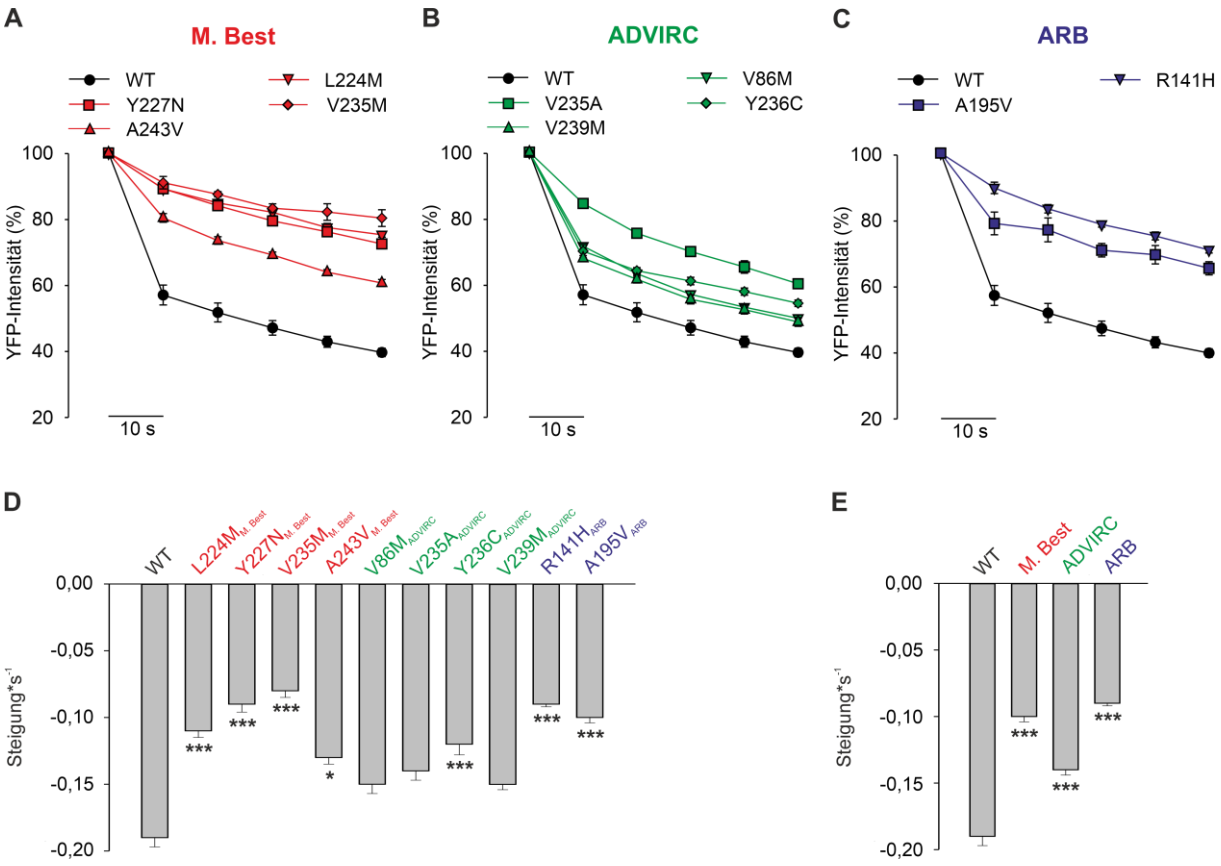


Abbildung 18: Repräsentative Kurven und Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. Repräsentative Kurven der YFP-Fluoreszenzintensitäten von MDCKII-Zellen, die WT BEST1 oder **(A)** M. Best- (L224M$_{M. Best}$, Y227N$_{M. Best}$, V235M$_{M. Best}$ und A243V$_{M. Best}$), **(B)** ADVIRC- (V86M$_{ADVIRC}$, V235A$_{ADVIRC}$, Y236C$_{ADVIRC}$ und V239M$_{ADVIRC}$) bzw. **(C)** ARB- (R141H$_{ARB}$ und A195V$_{ARB}$) assoziierte BEST1 Varianten exprimieren. Zur Messung der YFP-Fluoreszenzintensitäten wurden MDCKII-Zellen mit Natriumiodid-Lösung (100 mM Iodid) inkubiert, welche anschließend durch Natriumchlorid-Lösung ersetzt worden ist. Der Ausstrom der Chlorid-Ionen und gleichzeitige Einstrom der Iodid-Ionen bewirkte eine Abnahme der YFP-Fluoreszenzintensität, die somit ein Maß für die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität darstellt. Repräsentative Kurven sind dargestellt als Mittelwert ± SE von acht technischen Replikaten. **(D)** Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten von jeder einzelnen MDCKII-Zelllinie aus (A) bis (C). **(E)** Quantifizierung der Steigungen der YFP-Fluoreszenzintensitäten von den MDCKII-Zelllinie zusammengefasst aus (D) im Halogenidtransport-Assay. Die Steigung ist angegeben als Steigung*s^{-1} von der anfangs maximalen YFP-Fluoreszenzintensität zur minimalen YFP-Fluoreszenzintensität nach 60 s Inkubation mit Natriumchlorid-Lösung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SE von acht technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 7 - 22). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05 und *** p = < 0,001 relativ zum WT. Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien.

Werden nun die Ergebnisse des Halogenidtransport-Assays der ADVIRC MDCKII-Zelllinien, mit denen der ADVIRC hiRPE-Zelllinie verglichen, zeigte sich ein deutlicher Unterschied. In den unabhängigen Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zelllinien, die beide die Mutation p.(V86M) exprimieren, war eindeutig eine gesteigerte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien zu erkennen. Dagegen wiesen die MDCKII-Zellen, die vier unterschiedliche ADVIRC-assoziierte *BEST1* Mutationen exprimieren, zwar eine höhere

BEST1-vermittelte Membranpermeabilität als die M. Best MDCKII-Zellen auf, jedoch waren diese nicht signifikant höher als in den WT MDCKII Zelllinien. In folgenden Versuchen wurde daher ausgeschlossen, dass dieses Ergebnis aufgrund der Methodik bzw. der Qualität der MDCKII-Zellen zustande gekommen ist. Es kann vermutet werden, dass aufgrund der hohen Iodid-Konzentration von 100 mM im Halogenidtransport-Assay eine Sättigung der BEST1-Kanäle stattgefunden hat, was letztendlich eine Stresssituation für die Zellen darstellt. Daher wurde zuerst in einem unabhängigen Versuchsansatz der Halogenidtransport-Assay mit einer Iodid-Konzentration von 40 mM wiederholt. Darüber hinaus wurde analog zu den Versuchen mit den hiRPE-Zellen der Ausstrom der Iodid-Ionen gemessen. Verwendet wurden die ADVIRC Varianten V235A$_{ADVIRC}$ und V86M$_{ADVIRC}$. Die MDCKII-Zelllinien, die WT BEST1 bzw. V86M$_{ADVIRC}$ exprimieren, zeigten beide eine ähnlich schnelle Kinetik der ansteigenden YFP-Fluoreszenzintensitäten auf ~ 185 % (WT: 185,56 % ± 2,30 % und V86M$_{ADVIRC}$: 182,70 % ± 3,80 %), während V235A$_{ADVIRC}$ etwas niedrigere Werte von ~ 145 % aufwies (145,66 % ± 1,99 %) (**Abbildung 19A**). Um das Ergebnis zu verifizieren wurden in einem zweiten Schritt je drei neu generierte unabhängige V86M$_{ADVIRC}$ und V235A$_{ADVIRC}$ MDCKII-Zelllinien getestet. Alle V86M$_{ADVIRC}$ MDCKII-Zelllinien wiesen eine Kinetik der ansteigenden YFP-Fluoreszenzintensität zwischen ~ 189 % und 195 % auf (V86M-A: 195,26 % ± 3,23; V86M-B: 190,45 % ± 3,12 % und V86M-C: 188,94 % ± 5,67 %), wohingegen die V235A$_{ADVIRC}$ MDCKII-Zelllinien Werte im Bereich zwischen ~ 144 % und 148 % lieferten (V235A-A: 144,36 % ± 4,07 %; V235A-B: 144,45 % ± 4,59 % und V235A-C: 148,45 % ± 2,91 %) (**Abbildung 19B**). Dies entspricht den Werten aus **Abbildung 19A**. Die Wiederholung des Halogenidtransport-Assays mit den ADVIRC MDCKII-Zelllinien bestätigte die vorherigen Ergebnisse aus **Abbildung 18** und verdeutlicht, dass die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den hiRPE- und den MDCKII-Zellen nicht aufgrund der Methodik oder der Qualität der MDCKII-Zellen zustande gekommen sind.

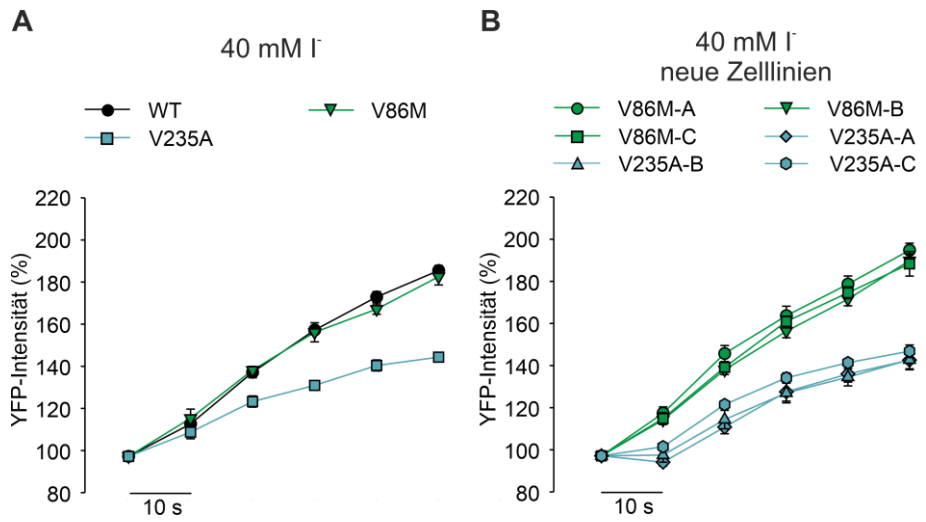


Abbildung 19: Repräsentative Kurven der YFP-Fluoreszenzintensitäten in der Wiederholung des Halogenidtransport-Assays mit ADVIRC MDCKII-Zellen. Repräsentative Kurven der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay von **(A)** MDCKII-Zellen, die WT BEST1, V86M$_{ADVIRC}$ oder V235A$_{ADVIRC}$ exprimieren, und **(B)** drei neu generierten unabhängige V86M$_{ADVIRC}$ (V86M-A, V86M-B und V86M-C) oder V235A$_{ADVIRC}$ (V235A-A, V235A-B und V235A-C) MDCKII-Zelllinien. Zur Messung der YFP-Fluoreszenzintensitäten wurden MDCKII-Zellen mit Natriumiodid-Lösung (40 mM Iodid) inkubiert, welche anschließend durch Natriumchlorid-Lösung ersetzt worden ist. Der Einstrom der Chlorid-Ionen und gleichzeitige Ausstrom der Iodid-Ionen bewirkte eine Zunahme der YFP-Fluoreszenzintensität, die somit ein Maß für die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität darstellt. Repräsentative Kurven sind dargestellt als Mittelwert ± SE von acht technischen Replikaten. Schwarz = WT Zelllinie; grün = V86M$_{ADVIRC}$ Zelllinien; hellblau = V235A$_{ADVIRC}$ Zelllinien.

4.3.3 Stabilität von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen

Milenkovic et al. (2018) belegten in transfizierten MDCKII-Zellen, dass BEST1 Protein assoziiert mit dem autosomal dominanten M. Best nach ~ 3 h zur Hälfte degradiert ist, wohingegen bei mutantem BEST1 Protein assoziiert mit der ARB, dies bereits nach ~ 1 - 2 h der Fall ist. Analog zu den Versuchen mit den hiRPE-Zellen wurde nun die Proteinstabilität in den MDCKII-Zelllinien untersucht (**Abschnitt 4.2.4**).

Repräsentative Western Blots veranschaulichten, dass WT BEST1 über 12 h eine stabile Proteinexpression vorweist. Demgegenüber demonstrierten die acht pathogenen Varianten einen unterschiedlich schnellen Proteinabbau in den MDCKII-Zelllinien (**Abbildung 20A**). Die Quantifizierung des verbleibenden Proteins nach 3 h Inkubation mit CHX zeigte eine signifikante Reduktion in den M. Best und ARB Zelllinien (WT: 87,97 % ± 11,91 %; M. Best: V235M$_{M. Best}$: 18,18 % ± 1,87 %; A243V$_{M. Best}$: 27,33 % ± 6,60 %; ARB: R141H$_{ARB}$: 11,00 % ± 2,29 % und A195V$_{ARB}$: 6,27 % ± 0,82 %). Im Vergleich dazu, wiesen – mit Ausnahme der Variante Y236C$_{ADVIRC}$ – die ADVIRC-assoziierten Varianten keinen signifikanten Unterschied zum WT auf (V86M$_{ADVIRC}$: 48,44 % ± 9,58 %; V235A$_{ADVIRC}$: 60,84 % ± 10,72 %; Y236C$_{ADVIRC}$: 38,59 % ± 11,88 % und V239M$_{ADVIRC}$: 56,76 % ± 5,40 %) (**Abbildung 20B**). Die Ergebnisse

stellen sich noch deutlicher dar, wenn die einzelnen Zelllinien zusammengefasst betrachtet werden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der M. Best- und ARB-assoziierten Varianten zum WT – nicht jedoch der ADVIRC-assoziierten. Außerdem war die Proteinexpression in den M. Best signifikant geringer als in den ADVIRC Zelllinien (WT: 87,97 % ± 11,91 %; M. Best: 20,88 % ± 2,44 %; ADVIRC: 52,75 % ± 5,27 % und ARB: 8,68 % ± 1,53 %) (**Abbildung 20C**).

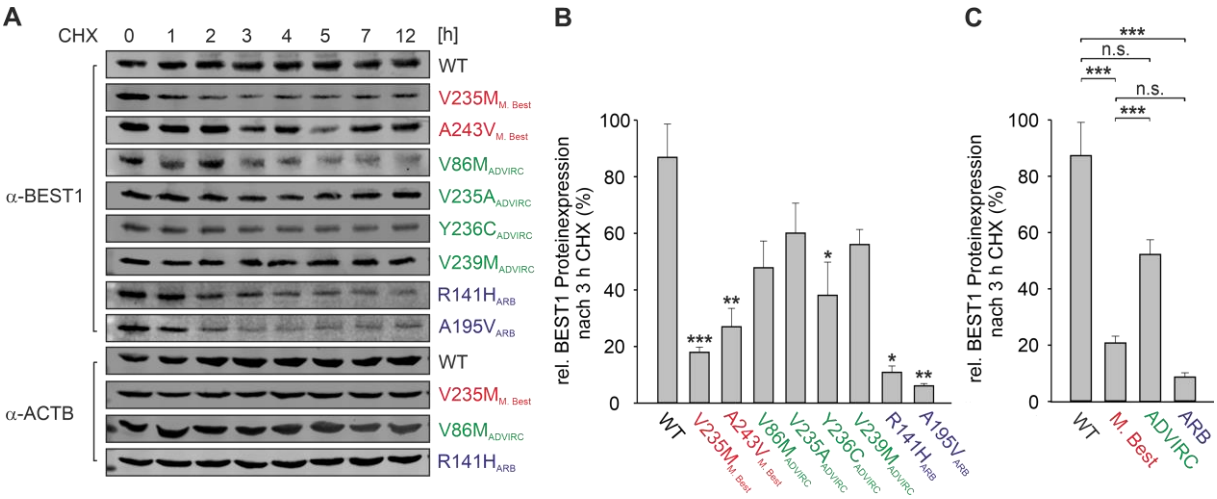


Abbildung 20: Stabilität von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. (A) Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von MDCKII-Zellen, die WT BEST1 oder M. Best- ($V235M_{M.\ Best}$ und $A243V_{M.\ Best}$), ADVIRC- ($V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$) bzw. ARB- ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$) assoziierte BEST1 Varianten exprimieren mit einem Antikörper gegen humanes BEST1. Die Zellen wurden mit CHX (20 µg/ml) inkubiert und nach 0 h bis 12 h geerntet. Anti-ACTB diente als Ladekontrolle. **(B)** Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression aus (A) nach 3 h Inkubation mit CHX. **(C)** Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression zusammengefasst aus (A) bzw. (B) nach 3 h Inkubation mit CHX. Die Normalisierung erfolgte auf ACTB desselben Blots. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SE von zwei technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 3 - 12). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** p = < 0,001 und n.s. = nicht signifikant und für (B) relativ zu WT. Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien.

Grundsätzlich konnte dargestellt werden, dass ADVIRC-assoziiertes BEST1 Protein stabiler ist als M. Best-assoziiertes, welches wiederum einem langsameren Abbau unterliegt als ARB-assoziiertes Protein. Letztere Ergebnisse stehen mit Milenkovic et al. (2018) im Einklang.

4.3.4 Analyse der Degradationswege von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen

Frühere Untersuchungen demonstrierten, dass autosomal dominant und autosomal rezessiv mutiertes BEST1 Protein in transfizierten MDCKII-Zellen einem unterschiedlichen Degradationsweg unterliegt (Milenkovic et al., 2018). Analog zu den Experimenten mit den hiRPE-Zellen (**Abschnitt 4.2.4**) wurde in der vorliegenden Arbeit der Abbauweg von fehlerhaftem BEST1 Protein in den neu generierten MDCKII-Zelllinien bestimmt.

Sowohl in repräsentativen Western Blots als auch in der Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression der einzelnen MDCKII-Zelllinien zeigte sich, dass ADVIRC-assoziiertes Protein über den lysosomalen Degradationsweg, gehemmt durch CQ, abgebaut wird und sich folglich wie autosomal dominant-assoziiertes Protein verhält (kein Inhibitor vs. CQ: $V86M_{ADVIRC}$: 29,98 % ± 4,84 % vs. 84,00 % ± 17,89 %; $V235A_{ADVIRC}$: 43,16 % ± 8,58 % vs. 106,02 % ± 22,26 %; $Y236C_{ADVIRC}$: 17,41 % ± 4,39 % vs. 92,13 % ± 28,00 % und $V239M_{ADVIRC}$: 20,37 % ± 3,21 % vs. 77,18 % ± 8,26 %) (**Abbildung 21A** und **Abbildung 21E-H**).

Darüber hinaus wurde bestätigt, dass das in der vorliegenden Arbeit untersuchte M. Best-assoziierte Protein über die Lysosomen (kein Inhibitor vs. CQ: $V235M_{M.Best}$: 11,61 % ± 2,46 % vs. 308,84 % ± 79,05 % und $A243V_{M.Best}$: 13,14 % ± 2,14 % vs. 149,55 % ± 51,31 %) (**Abbildung 21A** und **Abbildung 21C-D**) und ARB-assoziiertes Protein über die Proteasomen, inhibiert durch MG132, degradiert wird (kein Inhibitor vs. MG132: $R141H_{ARB}$: 6,48 % ± 1,52 % vs. 52,51 % ± 15,36 % und $A195V_{ARB}$: 3,68 % ± 0,68 % vs. 39,71 % ± 9,93 %) (**Abbildung** 21**B** und **Abbildung 21I-J**).

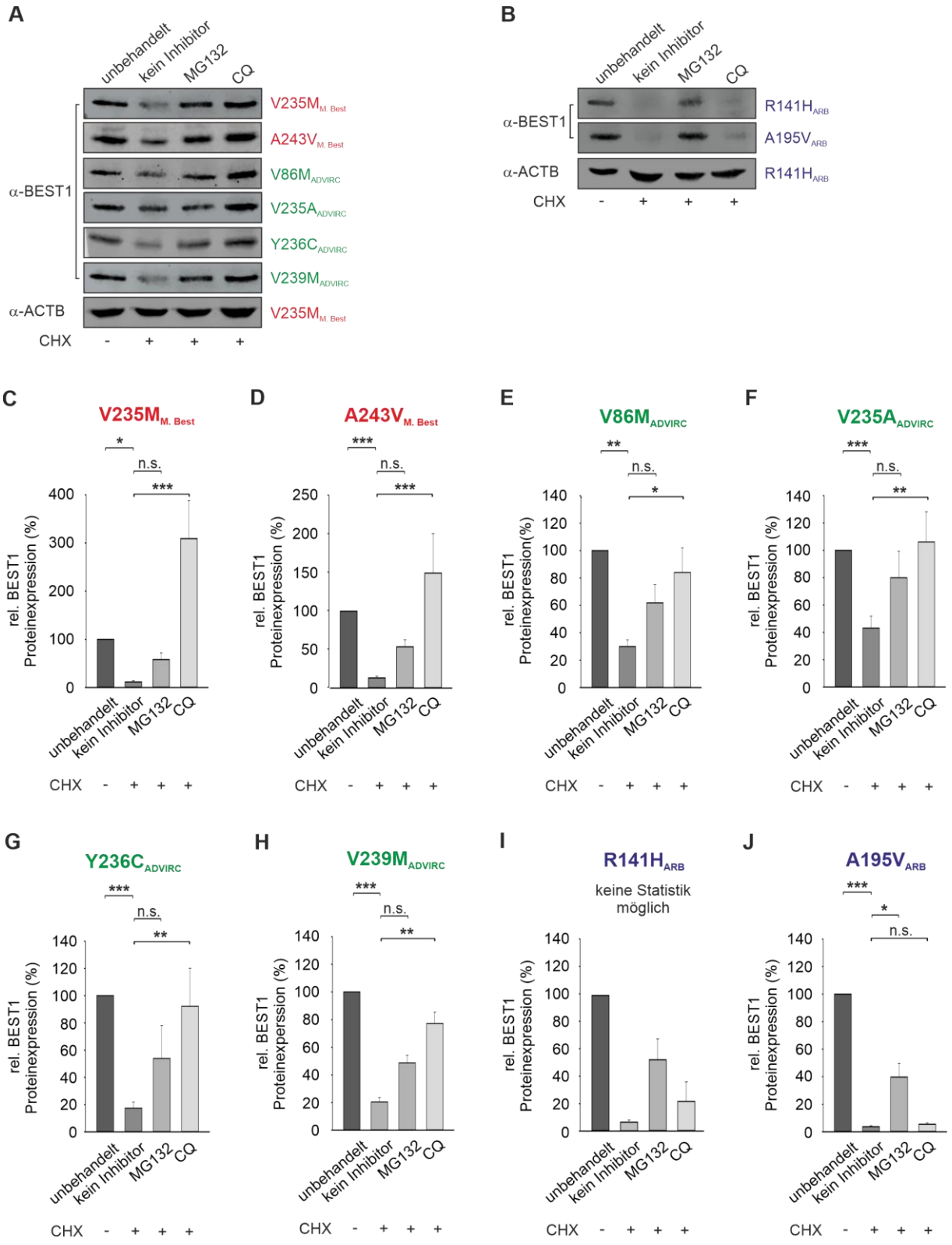


Abbildung 21: Degradationsweg von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von MDCKII-Zellen, die **(A)** M. Best- (V235M$_{M. Best}$ und A243V$_{M. Best}$) oder ADVIRC- (V86M$_{ADVIRC}$, V235A$_{ADVIRC}$, Y236C$_{ADVIRC}$ und V239M$_{ADVIRC}$) und **(B)** ARB- (R141H$_{ARB}$ und A195V$_{ARB}$) assoziierte BEST1 Varianten exprimieren, nach 7 h Inkubation mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (40 µM) oder dem lysosomalen Inhibitor CQ (50 µM) in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von CHX (20 µg/ml) mit einem Antikörper gegen humanes BEST1. Anti-ACTB diente als Ladekontrolle. Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression von MDCKII-Zellen aus (A) bzw. (B), die **(C-D)** M. Best- (V235M$_{M. Best}$ und A243V$_{M. Best}$), **(E-H)** ADVIRC- (V86M$_{ADVIRC}$, V235A$_{ADVIRC}$, Y236C$_{ADVIRC}$ und V239M$_{ADVIRC}$) und **(I-J)** ARB- (R141H$_{ARB}$ und

A195V$_{ARB}$) assoziierte BEST1 Varianten exprimieren. Die Werte sind normalisiert auf ACTB desselben Blots und relativ zur unbehandelten Probe angegeben. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SE von zwei technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 3 - 15). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** p = < 0,001 und n.s. = nicht signifikant. Für (I) konnte aufgrund der geringen Stichprobengröße keine statistische Beurteilung erfolgen.

Wenn die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien zusammengefasst betrachtet werden, wird deutlich, dass fehlerhaftes Protein sowohl in M. Best als auch ADVIRC Zelllinien vorwiegend über die Lysosomen, wohingegen fehlerhaftes Protein in ARB Zelllinien eindeutig über die Proteasomen degradiert wird (M. Best: kein Inhibitor: 12,49 % ± 1,57 %; MG132: 55,49 % ± 7,61 % und CQ: 217,52 % ± 48,15 %; ADVIRC: kein Inhibitor: 30,45 % ± 3,83 %; MG132: 64,73 % ± 9,21 % und CQ: 99,99 % ± 12,15 % und ARB: kein Inhibitor: 4,40 % ± 0,98 %; MG132: 52,11 % ± 10,30 % und CQ: 13,94 % ± 7,37 %) (**Abbildung 22**).

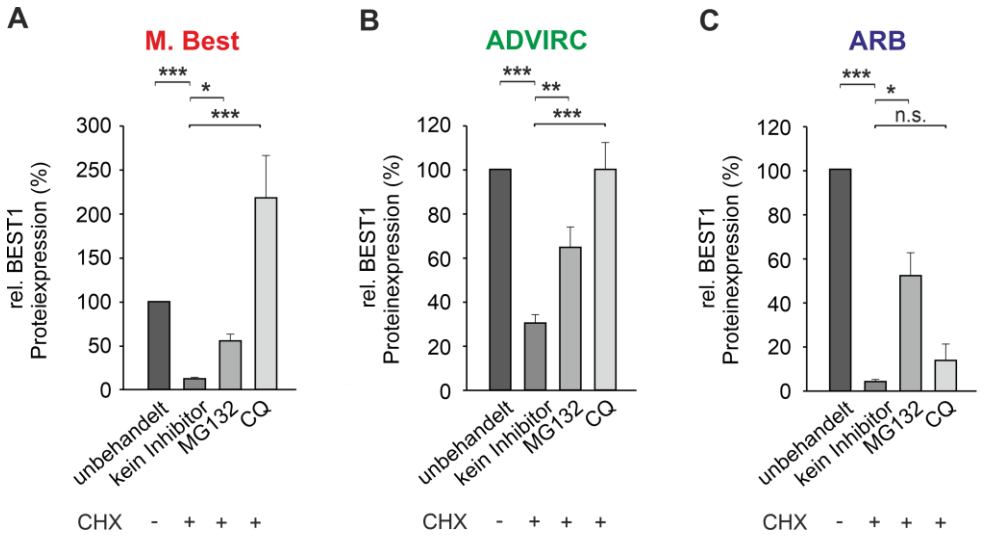


Abbildung 22: Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression zur Bestimmung des Degradationswegs von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression zusammengefasst aus **Abbildung 21** in **(A)** M. Best (V235M$_{M. Best}$ und A243V$_{M. Best}$), **(B)** ADVIRC (V86M$_{ADVIRC}$, V235A$_{ADVIRC}$, Y236C$_{ADVIRC}$ und V239M$_{ADVIRC}$) und **(C)** ARB (R141H$_{ARB}$ und A195V$_{ARB}$) MDCKII-Zellen. Die Werte sind normalisiert auf ACTB desselben Blots und relativ zur unbehandelten Probe angegeben. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SE von zwei technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 3 - 17). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** p = < 0,001 und n.s. = nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass fehlerhaftes BEST1 in den untersuchten M. Best und insbesondere auch in allen ADVIRC Zelllinien einer lysosomalen Degradation unterliegt, während ARB-assoziiertes Protein im Proteasom abgebaut wird. Daraus kann geschlossen werden, dass der autosomal dominante bzw. autosomal rezessive Erbgang die Route der Degradation bestimmt, jedoch nicht die unterschiedliche phänotypische Ausprägung des M. Best bzw. ADVIRC erklären kann.

4.3.5 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die ER-Homöostase in MDCKII-Zellen

Sowohl Studien mit transfizierten MDCKII-Zellen (Milenkovic et al., 2018) als auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente mit hiRPE-Zellen (**Abschnitt 4.2.5**) demonstrierten, dass eine erhöhte Degradation einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Proteasoms und der Lysosomen besitzt. Nachfolgend sollen diese Erkenntnisse in den neu generierten MDCKII-Zelllinien analysiert werden.

Ist eine Zelle erhöhtem ER-Stress ausgesetzt, wird die ungefaltete Proteinantwort (*unfolded protein response*, UPR) initiiert. Dabei spielt unter anderem der Transkriptionsfaktor XBP1 (*X-box binding protein 1*) eine wichtige Rolle. Das *XBP1* Transkript hat eine Größe von 287 bp, wird jedoch infolge von erhöhtem ER-Stress in eine 26 bp kleinere aktive Form gespleißt (nicht gespleißt: 287 bp; gespleißt: 261 bp) (Wang et al., 2014). Die Inkubation von WT MDCKII-Zellen mit dem ER-Stress-induzierenden Reagenz TG (1 µM) für 7 h resultierte in dem kleineren aktiven *XBP1* Transkript. Um ER-Stress zu veranlassen, wurden alle MDCKII-Zelllinien mit MG132 (20 µM) inkubiert. Daraufhin ergab sich im WT wie auch in allen autosomal dominant-assoziierten Varianten ($V235M_{M.\ Best}$, $V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$) nur die inaktive nicht gespleißte *XBP1* Form. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden autosomal rezessiven Linien ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$) eindeutig zusätzlich das kleinere gespleißte Transkript. In der Variante $A243V_{M.\ Best}$ konnte auch die aktive Form detektiert werden (**Abbildung 23**).

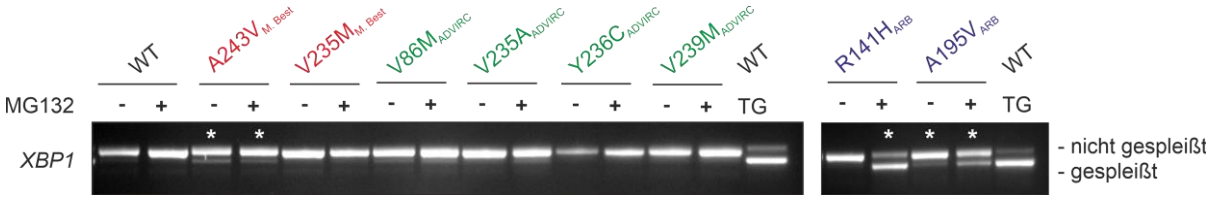


Abbildung 23: Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf das Spleißen von *XBP1* als Indikator für ER-Stress in MDCKII-Zellen. Zellen wurden in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von MG132 (20 µM) für 7 h inkubiert. Semi-quantitative RT-PCR der Gesamt-RNA resultierte in einem 287 bp großem *XBP1* Transkript (nicht gespleißt) (WT, $V235M_{M.\ Best}$, $V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$). In Folge von erhöhtem ER-Stress wird ein 26 bp großes *XBP1* Fragment von der XBP1 mRNA durch Spleißen entfernt (gespleißt: 261 bp) (mit * gekennzeichnet: $A243V_{M.\ Best}$, $R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$). TG (1 µM) diente zur Induktion von ER-Stress. Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien.

4.3.6 Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die lysosomale Homöostase in MDCKII-Zellen

In einem nächsten Schritt wurde analog zu den Untersuchungen mit den hiRPE-Zellen der Reifungsprozess der lysosomalen Protease CTSD untersucht (**Abschnitt 4.2.5**). Als lysosomaler Stressor diente die Vorkonditionierung der MDCKII-Zelllinien mit CQ (50 µM) für 7 h. Anschließend wurden die verschiedenen Reifungsstufen von CTSD in Ganzzell-Lysaten mittels Western Blot nachgewiesen.

Dabei zeigten lediglich die M. Best- und die ADVIRC-assoziierten Zelllinien die ~ 55 kDa pro-Form ($V235M_{M.\ Best}$, $A243V_{M.\ Best}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$), was auf einen erhöhten Proteinabbau in den Lysosomen zurückzuführen ist. Eine Ausnahme bildete die Variante $V86M_{ADVIRC}$ – hier war es nicht möglich die pro-Form zu detektieren. In den ARB Zelllinien konnten lediglich die beiden ~ 34 kDa und ~ 14 kDa reifen Formen von CTSD beobachtet werden ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$). Die pro-Form des Enzyms war auch in den WT MDCKII-Zellen nachweisbar. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Degradation von nicht-mutiertem BEST1 im Zuge des Membranproteinumsatzes in den Lysosomen stattfindet, was bereits für viele andere Plasmamembranproteine beschrieben wurde (Duncan et al., 2006; Varghese et al., 2008) (**Abbildung 24**).

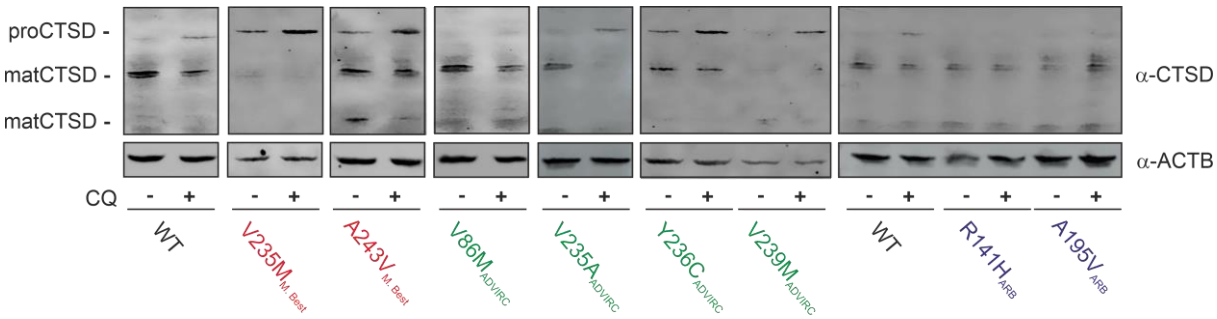


Abbildung 24: Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die Reifung des lysosomalen Enzyms CTSD in MDCKII-Zellen. Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von MDCKII-Zellen, die M. Best- ($V235M_{M.\ Best}$ und $A243V_{M.\ Best}$), ADVIRC- ($V86M_{ADVIRC}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$) oder ARB- ($R141H_{ARB}$ und $A195V_{ARB}$) assoziierte BEST1 Varianten exprimieren. Zellen wurden ohne (-) oder mit (+) CQ (50 µM) für 7 h inkubiert. Mit einem Antikörper gegen CTSD konnte eine inaktive kurzlebige pro-Form (proCTSD; ~ 55 kDa) (nur in WT, $V235M_{M.\ Best}$, $A243V_{M.\ Best}$, $V235A_{ADVIRC}$, $Y236C_{ADVIRC}$ und $V239M_{ADVIRC}$ in Folge von erhöhtem lysosomalen Stress) und zwei reife aktive Formen (matCTSD; ~ 34 kDa und ~ 14 kDa) detektiert werden. Anti-ACTB diente als Ladekontrolle. Schwarz = Kontroll-Zelllinien; rot = M. Best Zelllinien; grün = ADVIRC Zelllinien; dunkelblau = ARB Zelllinien.

Zusammengefasst verdeutlichen die Ergebnisse, dass das erhöhte lysosomale Degradationsaufkommen in den ADVIRC MDCKII-Zellen mit einer Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit der Lysosomen einhergeht. Das gleiche gilt für die neu generierten M. Best MDCKII-Zelllinien.

4.3.7 Koexpression von wildtypischem und mutiertem BEST1 in MDCKII-Zellen

Die Überexpression von mutantem BEST1 Protein in MDCKII-Zellen ermöglicht es, den Einfluss verschiedener pathogener BEST1 Varianten auf zelluläre Funktionen zu untersuchen. Bei autosomal dominant vererbten Erkrankungen, wird neben dem fehlerhaftem jedoch auch das normale Protein exprimiert. Im Fall der autosomal dominanten Bestrophinopathien beeinträchtig der Einbau einer fehlerhaften Protein-Untereinheit in den Multimer-Komplex dessen Gesamtfunktion negativ, was als dominant-negativer Effekt bezeichnet wird (Yu et al., 2006; Davidson et al., 2011; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2013).

Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden mittels der Grenzverdünnungsklonierungs-Strategie MDCKII-Koexpressions-Zelllinien generiert, die neben den M. Best- und ADVIRC-assoziierten Mutationen auch wildtypisches BEST1 exprimieren (WT: WT+WT-1D4; M. Best: V235M+WT-1D4, A243V+WT-1D4; ADVIRC: V235A+WT-1D4, Y236C+WT-1D4 und V239M+WT-1D4). Damit innerhalb der Zelle zwischen mutantem und wildtypischem Protein unterschieden werden kann, kamen zwei verschiedene Antikörper zum Einsatz: Das mutante Protein wurde von einem Antikörper gegen humanes BEST1 detektiert. Zur Erkennung des wildtypischen BEST1 wurde die BEST1 cDNA um 45 bp gekürzt (was dem Epitop des humanen BEST1 Antikörpers entspricht) und eine Rho1D4-Markierung angefügt. Somit wird wildtypisches BEST1 von einem Antikörper gegen Rho1D4 erkannt.

Um aufzuzeigen, ob das wildtypische BEST1 Protein durch die Rho1D4-Markierung in seiner Funktion beeinträchtigt wird, wurde zunächst der Halogenidtransport-Assay zur Messung der BEST1-vermittelten Membranpermeabilität analog zu den einfach transfizierten MDCKII-Zellen durchgeführt (**Abschnitt 4.3.2**). Die MDCKII-Zelllinie, die normales nicht-markiertes BEST1 exprimiert (WT), demonstrierte eine schnelle Kinetik der abnehmenden YFP-Fluoreszenzintensität auf 39,15 % ± 1,28 %, wohingegen die Zelllinie, die normales markiertes BEST1 exprimiert (WT-1D4), auf Werte von 62,39 % ± 5,20 % kam. Als Kontrolle wurden MDCKII-Zellen mitgeführt, die kein BEST1 exprimieren (MDCKII). Diese demonstrierten eine Kinetik der abnehmenden YFP-Fluoreszenzintensitäten auf 79,64 % ± 2,09 %, was die Anionenfluxe endogener Chlorid-Kanäle in den untransfizierten MDCKII-Zellen repräsentiert (**Abbildung 25A**). Die Darstellung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten der Zelllinien demonstrierte einen signifikanten Unterschied sowohl in der WT-1D4 als auch in der untransfizierten MDCKII-Zelllinie im Vergleich zum WT (Steigung*s^{-1} von WT: -0,19 ± 0,007; WT-1D4: -0,12 ± 0,008 und MDCKII: -0,07 ± 0,005). Da jedoch die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität in den WT-1D4 Zellen sehr viel größer ist als in den untransfizierten MDCKII-Zellen, lässt sich schlussfolgern, dass das Anfügen der

Rho1D4-Markierung nur einen minimalen Einfluss auf die BEST1-Kanalfunktion ausübt und die WT-1D4 Zellen daher für weiter Experimente verwendet werden können (**Abbildung 25B**).

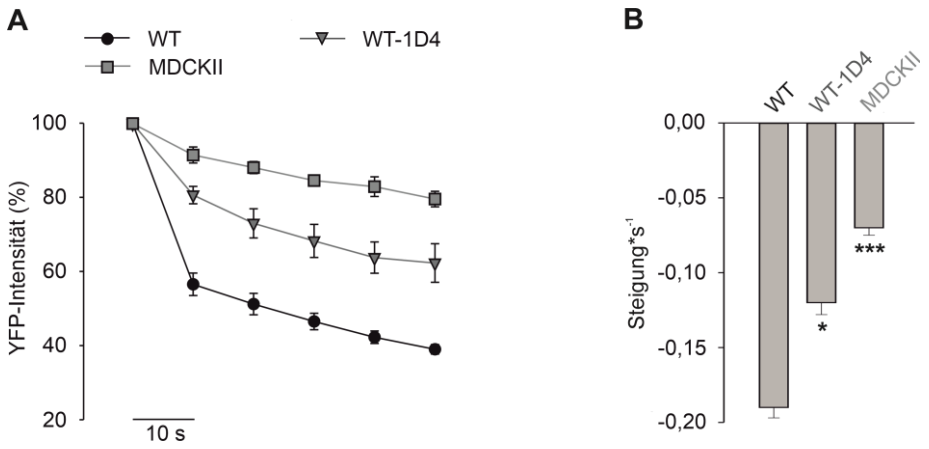


Abbildung 25: Repräsentative Kurven und Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit MDCKII-Zellen, die normales nicht-markiertes BEST1 (WT) oder normales markiertes BEST1 (WT-1D4) exprimieren bzw. untransfiziert (MDCKII) sind. (A) Repräsentative Kurven der YFP-Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Zellen. Zur Messung der YFP-Fluoreszenzintensitäten wurden MDCKII-Zellen mit Natriumiodid-Lösung (100 mM Iodid) inkubiert, welche anschließend durch Natriumchlorid-Lösung ersetzt worden ist. Der Ausstrom der Chlorid-Ionen und gleichzeitige Einstrom der Iodid-Ionen bewirkte eine Abnahme der YFP-Fluoreszenzintensität, die somit ein Maß für die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität darstellt. Repräsentative Kurven sind dargestellt als Mittelwert ± SE von acht technischen Replikaten. **(B)** Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten der MDCKII-Zelllinien im Halogenidtransport-Assay aus (A). Die Steigung ist angegeben als Steigung*s^{-1} von der anfangs maximalen YFP-Fluoreszenzintensität zur minimalen YFP-Fluoreszenzintensität nach 60 s Inkubation mit Natriumchlorid-Lösung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SE von acht technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 8 - 22). Die statistische Analyse wurde unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt, gefolgt von dem Post-hoc Dunn's Test zur Korrektur für Multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode. Signifikanzen sind angegeben mit * = $p < 0,05$ und *** $p = < 0,001$ relativ zum WT.

In einem nächsten Schritt wurde mittels Sanger-Sequenzierung nach PCR-Amplifikation der cDNA verifiziert, dass die neu generierten Koexpressions-Zelllinien die korrekten BEST1 Varianten in Exon 6 (V235M+WT-1D4, V235A+WT-1D4 und Y236C+WT-1D4) bzw. Exon 7 (V239M+WT-1D4 und A243V+WT-1D4) sowie das wildtypische Konstrukt koexprimieren (**Abbildung 26**).

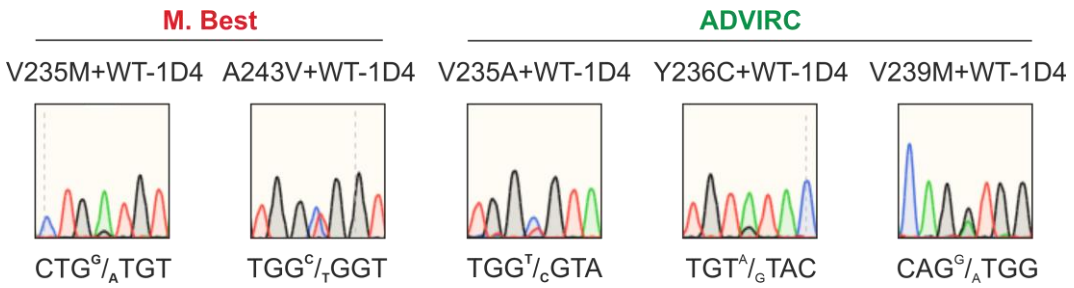


Abbildung 26: Sanger-Sequenzierungen nach PCR-Amplifikation der *BEST1* cDNA der MDCKII-Koexpressions-Zelllinien. Untersucht wurden die mit M. Best- (V235M+WT1-D4 und A243V+WT-1D4) und die mit ADVIRC-assoziierten (V235A+W1-D4, Y236C+WT-1D4 und V239M+WT-1D4) MDCKII-Koexpressions-Zelllinien. Die Zellen exprimieren sowohl die mutierte als auch die wildtypische Variante. Zur Verifizierung der korrekten BEST1 Variante wurde der Primer Tu15_NEW_R2 verwendet (**Tabelle 8**). Die Abbildung wurde mit SnapGene® erstellt.

Die anschließende immunzytochemische Färbung der polarisierten MDCKII-Koexpressions-Zellen WT+WT-1D4 gegen BEST1 und Rho1D4 bestätigte eine korrekte Lokalisation beider BEST1 Proteine an der basolateralen PM. In den M. Best-assoziierten (V235M+WT-1D4 und A243V+WT-1D4) sowie in den ADVIRC-assoziierten Zellen (V235A+WT-1D4, Y236C+WT-1D4 und V239M+WT-1D4) verlor das wildtypische Protein infolge des dominant-negativen-Effekts die Plasmamembranständigkeit analog zur Lokalisation des mutanten Proteins. Es war jedoch auch eine unregelmäßige Struktur der doppelt transfizierten MDCKII-Zellen zu erkennen, die möglicherweise auf einen durch die gleichzeitige Überexpression von zwei Proteinen erhöhten Stress zurückzuführen ist (**Abbildung 27**).

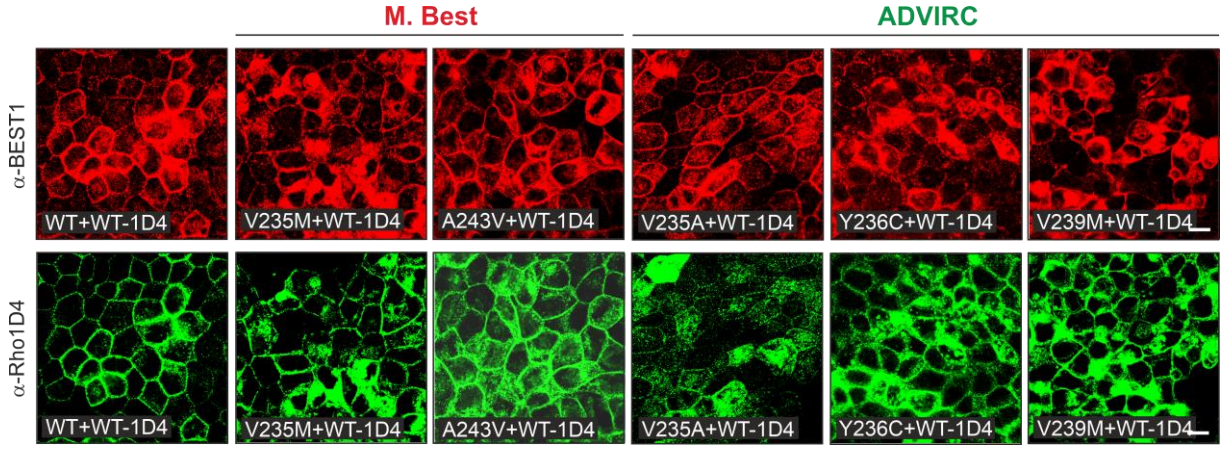


Abbildung 27: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation von BEST1 in M. Best und ADVIRC MDCKII-Koexpressions-Zelllinien. Protein-Lokalisation in MDCKII-Zellen, die mutantes BEST1 assoziiert mit M. Best (V2535M+WT-1D4 und A243V+WT-1D4) oder ADVIRC (V235A+WT-1D4, Y236C+WT-1D4 und V239M+WT-1D4) und wildtypisches BEST1 koexprimieren. Die Zellen wurden für fünf Tage bis zum Erreichen der Polarität auf Deckgläschen kultiviert und mit Antikörpern gegen humanes BEST1 (detektiert mutantes BEST1, rot) und Rho1D4 (detektiert wildtypisches BEST1, grün) gefärbt. Maßstabsleiste: 20 µm.

In abschließenden Experimenten wurde untersucht, ob in den Koexpressions-Zelllinien das mutante BEST1 Protein einen Einfluss auf die Stabilität des wildtypischen Proteins ausübt. Hierfür wurde analog zu den Experimenten mit den einfach transfizierten MDCKII-Zellen die Proteinbiosynthese mit CHX gestoppt und Ganzzell-Lysate über einen Zeitraum von 12 h stündlich gewonnen (**Abschnitt 4.3.3**). **Abbildung 28A** illustriert repräsentative Western Blots, die die Proteinexpression von mutantem und wildtypischem BEST1 Protein in den M. Best und ADVIRC MDCKII-Koexpressions-Zelllinien im Zeitverlauf zeigen. Die Quantifizierung des restlichen BEST1 Proteins am Zeitpunkt 3 h demonstrierte eindrücklich den dominant-negativen-Effekt des mutanten über das wildtypische BEST1. In allen fünf untersuchten M. Best und ADVIRC MDCKII-Koexpressions-Zelllinien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression zwischen mutantem und wildtypischem Protein (mutantes BEST1 vs. wildtypisches BEST1: M. Best: V235M+WT-1D4: 66,84 % ± 2,24 % vs. 21,16 % ± 7,79 % und A243V+WT-1D4: 17,42 % ± 4,14 % vs. 9,08 % ± 2,02 %; ADVIRC: V235A+WT-1D4: 43,93 % ± 6,09 % vs. 35,19 % ± 9,46 %; Y236C+WT-1D4: 53,44 % ± 8,31 % vs. 39,97 % ± 8,13 % und V239M+WT-1D4: 49,09 % ± 9,68 % vs. 50,62 % ± 16,24 %) (**Abbildung 28B**). Auch die Zusammenfassung der Ergebnisse der einzelnen Koexpressions-Zelllinien zeigte keinen Unterschied in der Proteinexpression zwischen mutantem und wildtypischem Protein (mutantes BEST1 vs. wildtypisches BEST1: M. Best: 17,16 % ± 2,37 vs. 14,46 % ± 3,97 %; ADVIRC: 48,85 % ± 4,59 % vs. 41,25 % ± 6,21 %) (**Abbildung 28C**).

Letztendlich demonstrierte sowohl die Untersuchung der Lokalisation als auch der Proteinstabilität den dominant-negativen-Effekt in den M. Best und ADVIRC MDCKII-Koexpressions-Zelllinien.

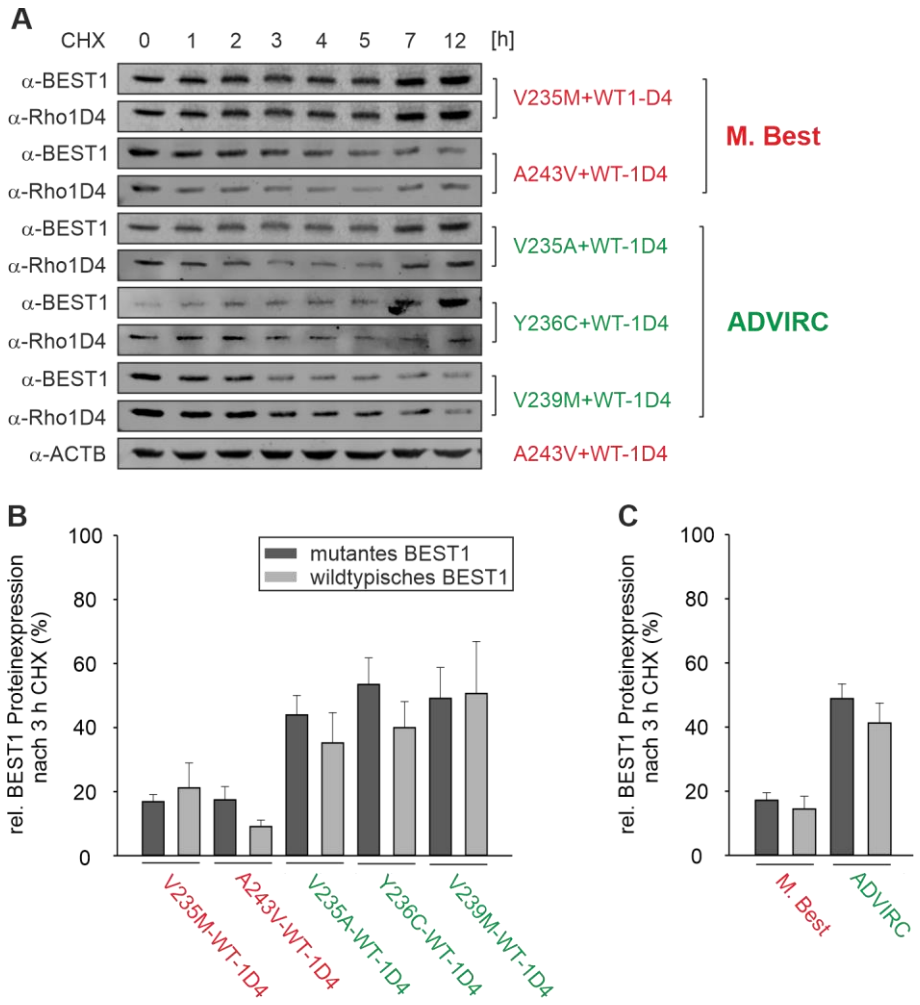


Abbildung 28: Stabilität von mutantem und wildtypischem BEST1 Protein in M. Best und ADVIRC MDCKII-Koexpressions-Zelllinien. (A) Repräsentative Western Blots von Ganzzell-Lysaten von MDCKII-Zellen, die mutantes BEST1 assoziiert mit M. Best (V2535M+WT-1D4 und A243V+WT-1D4) oder ADVIRC (V235A+WT-1D4, Y236C+WT-1D4 und V239M+WT-1D4) und wildtypisches BEST1 koexprimieren, mit einem Antikörper gegen mutantes BEST1 (α-BEST1) und wildtypisches BEST1 (α-Rho1D4). Die Zellen wurden mit CHX (20 µg/ml) inkubiert und nach 0 h bis 12 h geerntet. Anti-ACTB diente als Ladekontrolle. **(B)** Quantifizierung der Proteinexpression von mutantem und wildtypischem BEST1 in einzelnen M. Best (V2535M+WT-1D4 und A243V+WT-1D4) und ADVIRC (V235A+WT-1D4, Y236C+WT-1D4 und V239M+WT-1D4) Koexpressions-Zelllinien aus (A) nach 3 h Inkubation mit CHX (20 µg/ml). **(C)** Quantifizierung der Proteinmenge von mutantem und wildtypischem BEST1 in M. Best und ADVIRC Koexpressions-Zelllinien zusammengefasst aus (A) bzw. (B) nach 3 h Inkubation mit CHX. Die Normalisierung erfolgte auf ACTB desselben Blots. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SE von zwei technischen Replikaten pro einzelne Probe (n = 3 – 5). Rot = M. Best Koexpressions-Zelllinien; grün = ADVIRC Koexpressions-Zelllinie.

5 Diskussion

Das Besondere an den Bestrophinopathien ist der Aspekt, dass Mutationen in demselben Gen, *BEST1*, in unterschiedlichen Krankheitsbildern resultieren. Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die molekulare Pathologie bzw. spezifische Mechanismen zu untersuchen, welche zu der Entstehung der unterschiedlichen Krankheitsbilder beitragen. Mittels zwei *in vitro* Modellsystemen, hiRPE- und MDCKII-Zellen, wurden folgende Mechanismen betrachtet: (i) die Lokalisation des BEST1 Proteins in der Zelle, (ii) der Degradationsweg von fehlerhaftem BEST1 Protein und (iii) der Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität. Letztendlich konnte auf Basis dieser Mechanismen ein Modell zur Klassifizierung von *BEST1* Mutationen erstellt werden.

5.1 Untersuchungen zur molekularen Pathologie der Bestrophinopathien

Zur Untersuchung der molekularen Pathologie der Bestrophinopathien wurden in der vorliegenden Arbeit zwei *in vitro* Zellsysteme verwendet: Patienten-abgeleitete hiRPE-Zellen sowie MDCKII-Zelllinien, die stabil verschiedene BEST1 Varianten überexprimieren.

Humane iRPE-Zellen sind den nativen RPE-Zellen morphologisch und funktionell sehr ähnlich. Beispielsweise besitzen die Zellen eine hexagonale Form, sind pigmentiert, bilden Schlussleisten (*tight junctions*) und können POS prozessieren (Brandl et al., 2014). Ein großer Vorteil liegt außerdem in der endogenen Expression von BEST1 Protein, weswegen hiRPE-Zellen ein sehr physiologisches Modellsystem bilden. Zwar steht mittlerweile ein etabliertes Protokoll zur Reprogrammierung von adulten somatischen Zellen in hiPSC und zur anschließenden Differenzierung zu Zellen des RPEs zur Verfügung, jedoch liegt der Nachteil immer noch in der Kultivierung dieser Zelltypen, die sehr langwierig, zeit- und kostenintensiv ist.

MDCKII-Zellen stellen ein geeignetes Überexpressionssystem für Untersuchungen zur Lokalisation sowie zum Transport von Proteinen dar (Milenkovic et al., 2018). Die Zellen sind leicht zu manipulieren und kultivieren, weshalb ein breites Spektrum an pathogenen BEST1 Varianten untersucht werden kann. Der große Vorteil von MDCKII-Zellen ist deren Polarisierbarkeit: Zellen, die normales BEST1 exprimieren, zeigen eine korrekte Protein-Lokalisation an der basolateralen Membran (Davidson et al., 2009; Davidson et al., 2011; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2013; Johnson et al., 2014; Milenkovic et al., 2018). Der Nachteil von transfizierten MDCKII-Zellen liegt darin, dass sie weder ihren Ursprung in RPE-Zellen haben noch endogen BEST1 exprimieren.

Um die Vor- bzw. Nachteile der unterschiedlichen Modellsysteme auszugleichen und möglichst weitreichende Erkenntnisse zu gewinnen, die letztendlich auf den Menschen übertragen werden können, ist es daher sinnvoll, Experimente mit verschiedenen Zellsystemen durchzuführen.

5.1.1 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die Protein-Lokalisation

In nativem Gewebe ist BEST1 ausschließlich an der basolateralen Membran von RPE-Zellen lokalisiert (Marmorstein et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass normales BEST1 sowohl in hiRPE-Zellen als auch in transfizierten MDCKII-Zellen korrekt an der basolateralen PM lokalisiert. Dagegen führen drei der fünf untersuchten M. Best-assoziierten hiRPE-Zelllinien zu einer Fehllokalisation des Proteins im Zytoplasma (M. $Best_{IN}$: +/Q238R, +/I295del #1 und +/I295del #2). Bei allen anderen untersuchten *BEST1* Mutationen war BEST1 sowohl in hiRPE-Zellen als auch in transfizierten MDCKII-Zellen korrekt oder zumindest teilweise an der basolateralen Membran präsent (hiRPE-Zellen: M. $Best_{PM}$: +/N11K, +/R218C und +/A243V; ARB: N99K/R141H, +/R141H, A195V/L197PX26, +/A195V und +/L197PX26; ADVIRC: +/V86M #1 und +/V86M #2; MDCKII-Zellen: M. Best: V235M; ADVIRC: V86M, V235A, Y236C und V239M; ARB: R141H und A195V).

In früheren Transport- und Lokalisationsstudien im MDCKII-Zellmodell wurde bereits eine Vielzahl an *BEST1* Mutationen beschrieben, die die korrekte Lokalisation von pathogenem BEST1 demonstrieren oder aber eine intrazelluläre Fehllokalisation aufweisen (Davidson et al., 2009; Davidson et al., 2011; Milenkovic et al., 2011; Johnson et al., 2013; Johnson et al., 2014; Milenkovic et al., 2018). Daher wurde der gestörte Transport von BEST1 an die PM bereits früh als ein möglicher Pathomechanismus der Bestrophinopathien diskutiert, wie es auch schon für andere Ionenerkrankungen wie beispielsweise für Mukoviszidose, das Bartter-Syndrom oder das Dent-Syndrom beschrieben worden ist (Jentsch et al., 2005; Pedemonte und Galietta, 2012).

Bei Untersuchungen zur Lokalisation von Membranproteinen ist zu beachten, dass ein fehlerhafter Proteintransport ein häufig vorkommendes Phänomen in Modellsystemen ist, die auf transgener Überexpression basieren (Kintaka et al., 2016). Ein Beispiel liefert die ADVIRC-assoziierte Mutation p.(V235A). Im Zuge dieser Arbeit wie auch bei Johnson et al. (2014) ist das Protein primär an der basolateralen Membran in MDCKII-Zellen vorhanden. Jedoch zeigten Carter et al. (2016) eine basolaterale sowie stark apikale Lokalisation in Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zellen. Darüber hinaus wird die Mutation p.(W93C) in MDCKII-Zellen als intrazellulär beschrieben (Johnson et al., 2013), in fhRPE (Johnson et al.,

2013; Johnson et al., 2015) sowie im RPE der Ratte (Marmorstein et al., 2004) jedoch als korrekt lokalisiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Lokalisation von BEST1 Protein in der Zelle ein Mutations-spezifisches anstatt eines Phänotyp-spezifischen Kriteriums darstellt. Lediglich die M. Best-assoziierten Mutationen können hinsichtlich der basolateralen bzw. zytoplasmatischen Lokalisation in zwei Klassen eingeteilt werden

Bei M. Best-assoziierten Mutationen, die eine Membranlokalisation aufweisen, geht diese mit einer höheren Stabilität des Proteins einher, was auch für ADVIRC-assoziierte Mutationen gilt. Dagegen ist ARB-assoziiertes Protein zwar auch an der basolateralen Membran lokalisiert, jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl mit hiRPE-Zellen als auch mit MDCKII-Zellen demonstriert werden, dass das fehlerhafte Protein eine viel geringere Stabilität aufweist.

5.1.2 Degradationsweg von mutiertem BEST1 Protein

Unter Proteostase (auch Protein-Homöostase) werden alle zellulären Prozesse, die die Synthese (Translation), die post-translationale Modifikation sowie Faltung, den Transport, die Oligomerisierung und letztendlich die Degradation von Proteinen zusammengefasst (Powers et al., 2009). Eine Reihe von Qualitätskontrollpunkten sorgen für die Qualitäts- und Quantitätskontrolle dieser Vorgänge und regulieren den Proteinabbau. Die ER-assoziierte Degradation erkennt fehlgefaltetes Protein nach der Synthese am ER und vermittelt den Abbau über die Proteasomen (Sun und Brodsky, 2018). In einigen Fällen kann es allerdings vorkommen, dass fehlerhaftes Protein diesem Qualitätskontrollpunkt entkommt, intrazellulär aggregiert und von den Lysosomen abgebaut wird (Wang und Robbins, 2014).

Bereits 2016 zeigten erste Studien, dass ARB-assoziiertes Protein in MDCKII-Zellen weniger stabil ist und bevorzugt über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) degradiert wird (Uggenti et al., 2016). Diese Ergebnisse konnten in Arbeiten von Milenkovic et al. (2018) für zwei ARB-assoziierte *BEST1* Mutationen in demselben Modellsystem bestätigt werden. Zudem wurde das erste Mal für sechs M. Best-assoziierte *BEST1* Mutationen gezeigt, dass autosomal dominantes BEST1 einem anderen Abbauweg unterliegt, nämlich der lysosomalen Degradation (Milenkovic et al., 2018).

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur BEST1 Proteinstabilität und der Degradationswege für die M. Best- und ARB-assoziierten MDCKII-Zelllinien, die im Zuge dieser Arbeit untersucht worden sind, entsprechen den Studien von Milenkovic et al. (2018) und untermauern deren Resultate. Darüber hinaus konnten die Ergebnisse zum ersten Mal mit Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zellen, die endogen BEST1 exprimieren, verifiziert werden.

Ein limitierender Faktor des hiRPE-Modellsystems ist die größere Stabilität von fehlerhaften BEST1 Proteinkomplexen im Vergleich zum Überexpressionssystem in MDCKII-Zellen. Auch noch nach 12 h Behandlung der hiRPE-Zellen mit CHX war über 50 % des verbleibenden Proteins im Western Blot nachweisbar. So konnte für die autosomal dominanten Mutationen, die stabil sind und eine membranständige Lokalisation aufweisen (M. $Best_{PM}$: +/N11K, +/R218C und +/A243V sowie ADVIRC: +/V86M #1 und +/V86M #2), in hiRPE-Zellen der Degradationsweg nicht eindeutig bestimmt werden. Eine Begründung liegt womöglich darin, dass in hiRPE-Zellen das Vorhandensein von normalen BEST1-Monomeren den Kanalkomplex stabilisiert, was in MDCKII-Zellen nicht der Fall ist. Möglich wäre es, die Inkubationszeit von CHX und den Inhibitoren der Abbauwege zu verlängern. Wobei dann die Gefahr besteht, dass CHX toxisch für die Zelle wirkt, was letztlich zu einem verfrühten Zelltod führen kann. Aus diesem Grund konnte nur im MDCKII-Zellmodell gezeigt werden, dass fehlerhaftes Protein infolge von ADVIRC-assoziierten Mutationen über die Lysosomen degradiert wird und sich somit wie autosomal dominant-assoziiertes Protein verhält.

Im Zusammenhang mit dem gesteigerten Degradationsaufkommen in den Lysosomen infolge von M. Best- und ADVIRC-assoziierten *BEST1* Mutationen konnte in hiRPE-Zellen eine geänderte lysosomale Homöostase festgestellt werden. Nachdem die Zellen zwei Wochen täglich mit POS inkubiert worden sind, um lysosomalen Stress zu induzieren, verschob sich der pH_{Lys}-Wert nur in den Kontroll- und ARB Zelllinien ins stark saure Milieu. Als Konsequenz konnte nur in M. Best und ADVIRC hiRPE-Zellen die unreife pro-Form der lysosomale Protease CTSD detektiert werden, zu deren vollständigen Prozessierung ein definierter saurer pH-Bereich nötig ist.

Die Hauptaufgabe des RPEs besteht in der täglichen Degradation von POS durch die Lysosomen (Sparrow und Boulton, 2005). Die Störung dieses Prozesses wurde bereits mit mehreren Erkrankungen in Verbindung gebracht. So konnte in RP eine beeinträchtigte POS-Aufnahme der RPE-Zellen beobachtet werden (Lukovic et al., 2015; Ramsden et al., 2017). Im Morbus Stargardt (Lin et al., 2016; Esteve-Rudd et al., 2018; Keeling et al., 2018) und in der Altersbedingten Makula-Degeneration (AMD) (Bindewald et al., 2005; Lueck et al., 2012; Dalvi et al., 2019) ist die POS-Prozessierung gestört und auch für M. Best wiesen bereits einige Studien auf eine Beeinträchtigung der POS-Degradation hin (Singh et al., 2013a; Singh et al., 2013b; Singh et al., 2015; Marmorstein et al., 2018). Erstmals untersuchten Singh et al. (2013b) hiRPE-Zellen von M. Best Patienten. Infolge von Langzeit-Fütterung mit POS zeigten M. Best hiRPE-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen eine vermehrte Ansammlung von autofluoreszierendem Material sowie eine verringerte POS-Abbaurate. Jedoch konnte in Folgestudien weder ein Unterschied in der Lokalisation und Expression der lysosomalen Protease CTSD noch eine Störung im basalen pH_{Lys}-Wert detektiert werden (Singh et al.,

2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erst nach Vorkonditionierung durch CQ oder POS-Fütterung ein Unterschied in der Reifung von CTSD als Konsequenz eines erhöhten pH_{Lys}-Wertes in Zelllinien mit autosomal dominanten *BEST1* Mutationen aufgedeckt werden. Offensichtlich ist dieser Stressfaktor in der Zellkultur nötig, um die beeinträchtige lysosomalen Homöostase experimentell darzustellen. Dies ist durchaus logisch, denn die charakteristische Ablagerung des POS-Abbauprodukts Lipofuszin manifestiert sich erst in späteren Lebensdekaden von M. Best Patienten. Die tägliche Umsatzrate der Lysosomen über mehrere Jahre hinweg ist ein natürlicher Stressor, dem die RPE-Zellen ausgesetzt sind. Mittels der durchgeführten Experimente konnte eine direkte Verbindung zwischen dem Phänotyp des M. Best und des zugrundliegenden molekularen Pathomechanismus aufgezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in M. Best-assoziierten MDCKII- und hiRPE-Zellen bestätigt, dass fehlerhaftes Protein dem ersten Qualitätskontrollpunkt am ER entkommt und über die Lysosomen abgebaut wird. Eine solch gesteigerte lysosomale Degradation wurde bereits in Erkrankungen des Herzens und in der Kraniometaphysären Dysplasie (*craniometaphyseal dysplasia*, CMD) beschrieben (Kanaujiya et al., 2018). Studien belegen, dass die post-ER Degradation vor allem für Membranproteine gilt, die nur kleine Änderungen in ihrer Konformation besitzen (Coughlan et al., 2004; Wang und Ng, 2010). So ist dieser Abbauweg ein häufig beschriebener Mechanismus für fehlgefaltetes Protein in der Hefe (Chang und Fink, 1995; Wang und Ng, 2010). In Säugetierproteinen konnte für Connexin 43 (Cx43; auch *Gap junction alpha-1 protein*, GJA1), den T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) und für α-1-Antitrypsin (*α1-antitrypsin protein*, AAP) nachgewiesen werden, dass unvollständige Komplexe im Golgi-Apparat zurückgehalten werden und dem Abbau über die Lysosomen unterliegen (Sussman et al., 1988; Ashok und Hegde, 2009; Vanslyke et al., 2009).

Zusätzlich wurde im Zuge dieser Arbeit untersucht, ob die erhöhte Degradation von autosomal rezessivem BEST1 Protein in den Proteasomen zu einem erhöhten ER-Stress führt. Infolge von ER-Stress wird das Spleißen von *XBP1* verursacht, was wiederum die UPR induziert. Lediglich in MDCKII-Zellen, die ARB-assoziierte Mutationen exprimieren, konnte das gespleißte *XBP1* Transkript detektieren werden, was auf eine Beeinträchtigung der ER-Homöostase exklusiv in diesen Zellen hinweist. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, diesen Effekt in ARB hiRPE-Zellen festzustellen (Daten nicht gezeigt). Eine Begründung könnte hierfür wieder die heterozygote Konstellation von normalem und fehlerhaftem Protein in den hiRPE-Zellen sein. Möglicherweise würde es mit einem anderen ER-Stressor und anderen Versuchsbedingungen wie beispielsweise einer längeren Inkubationszeit gelingen, den Effekt in der Zellkultur nachzuweisen.

Der Degradationsweg steht im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Vererbungsformen der *BEST1* Mutationen. So führt der schnelle Abbau von fehlerhaftem Protein über die

Proteasomen in heterozygoten Trägern einer ARB-assoziierten Mutation zu einer Oligomerisierung von primär normalen BEST1-Monomeren. Dagegen unterliegt autosomal dominantes Protein der post-ER Degradation über die Lysosomen, weswegen die Wahrscheinlichkeit, dass sich fehlerhafte Untereinheiten in das Homopentamer einbauen, erhöht ist und der Kanal folglich nicht mehr seine Funktion erfüllen kann (nach Milenkovic et al., 2018). Es ist anzunehmen, dass schon der Einbau von einem fehlerhaften Monomer reicht, um die Funktion des Kanals erheblich zu beeinträchtigen. Je mehr fehlerhafte Untereinheiten sich in dem Homopentamer befinden, desto größer ist die Funktionsstörung und letztendlich die Ausprägung der autosomal dominanten Erkrankung.

Generell ist der Degradationsweg von fehlerhaftem Protein ein eindeutiger Mechanismus zur Differenzierung von *BEST1* Mutationen, die zur autosomal dominanten bzw. autosomal rezessiven Bestrophinopathie führen.

Eine spezielle *BEST1* Mutation ist p.(A243V). Sie wurde erstmals von Krämer et al. (2000) identifiziert und resultiert in einem spezifischen Phänotyp, der sogenannten Musterdystrophie. Hierbei zeigen Patienten anstelle einer vitelliformen Läsion musterartige Pigmentveränderungen, die mit einem späteren Erkrankungsalter, einem milden Verlauf und mit einem begrenzten Visusverlust einhergehen (Boon et al., 2009; Khan et al., 2018b).

Das fehlerhafte Protein lokalisiert in der vorliegenden Arbeit in hiRPE-Zellen an der basolateralen Membran und in MDCKII-Zellen vorwiegend intrazellulär. Milenkovic et al. (2015) veranschaulichten, dass p.(A243V) in hiRPE-Zellen teilweise an der PM, vorwiegend jedoch im Zytoplasma präsent ist. In MDCKII-Zellen wurde in einer früheren Studie eine korrekte basolaterale Lokalisation beschrieben (Johnson et al., 2014). Zwar zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass in MDCKII-Zellen, die die Mutation p.(A243V) exprimieren, das fehlerhafte Protein über die Lysosomen abgebaut wird, jedoch demonstrierten auch die Proteasomen einen erhöhten Stress, was in dem detektierten gespleißten *Xbp1* Transkript erkennbar ist. Dies lässt vermuten, dass diese Mutation noch andere zelluläre Mechanismen beeinflusst und es daher zu diesem speziellen Phänotyp kommt. Von Fung et al. (2015) wurde die *BEST1* Mutation p.(A234E) beschrieben. Interessanterweise führt hier der Austausch von der Aminosäure Alanin nach Glutaminsäure an der Aminosäureposition 243 zum Krankheitsbild der ARB. Als zweite *BEST1* Mutation wurde bei dem Patienten p.(R200*) identifiziert, welche in einem Stopcodon und letztlich in einem verkürzten Protein resultiert (Burgess et al., 2008).

Weiterführende Studien, vor allem mit hiRPE-Zellen von Patienten, die die *BEST1* Mutationen p.(A243V) bzw. p.(A243E) tragen, sind nötig, um eindeutig die Lokalisation sowie den Degradationsweg von dem fehlerhaften Protein zu bestimmen. Experimente könnten gezielt den Einfluss der einzelnen mutierten Aminosäuren auf die Sekundär- und Tertiärstruktur des

BEST1 Proteins betrachten und untersuchen, welchen Einfluss die Änderungen auf zelluläre Mechanismen wie Proteinsynthese, -faltung, und -transport ausüben und letztendlich die Entstehung der spezifischen Phänotypen erklären.

5.1.3 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelten Membranpermeabilität

Mit dem Halogenidtransport-Assay kann die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität in hiPRE- sowie in MDCKII-Zellen gemessen und somit indirekt die Funktion der BEST1-Kanäle bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in beiden Modellsystemen eine deutlich reduzierte Kanalfunktion in M. Best und ARB Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen. *Patch-Clamp*-Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration von HEK293- sowie von hiRPE-Zellen, die verschiedene mit M. Best-assoziierte *BEST1* Mutationen exprimieren, belegten bereits in früheren Studien geringere Chlorid-Ströme im Vergleich zu Kontroll-Zellen (Yu et al., 2006; Burgess et al., 2008; Li et al., 2017; Ji et al., 2019a). Das gleiche gilt auch für HEK293-Zellen, die die ARB-assoziierte *BEST1* Mutation p.(R141H) exprimieren. Die Kotransfektion von p.(R141H) und normalem BEST1 resultierte in ähnlich hohen Chlorid-Strömen wie sie in der WT Kontrolle gemessen worden sind (Burgess et al., 2008; Johnson et al., 2015). Letztere Ergebnisse veranschaulichen den der ARB zugrundliegenden autosomal rezessiven Erbgang.

Die ADVIRC-assoziierten Mutationen resultierten in hiRPE-Zellen in einer signifikant höheren und in MDCKII-Zellen in einer zur Kontrolle vergleichbaren BEST1-vermittelten Membranpermeabilität. In zusätzlichen Versuchen wurde ausgeschlossen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der Modellsysteme aufgrund der Methodik oder der Qualität der Zellen zustande gekommen sind. Eine Begründung für die Diskrepanz liegt möglicherweise darin, dass im Gegensatz zu den einfach transfizierten MDCKII-Zellen, in hiRPE-Zellen normales und fehlerhaftes BEST1 jeweils zur Hälfte exprimiert wird. Höchstwahrscheinlich kann nur eine Kombination von normalen und mutanten BEST1-Monomeren im aus fünf Untereinheiten zusammengesetzten Anionenkanal eine erhöhte Membranpermeabilität verursachen. Als weiterführende Versuche wäre der Halogenidtransport-Assay mit MDCKII-Zellen, die normales, fehlerhaftes und den Biosensor $YFP_{H148Q/I152L}$ exprimieren, von großem Interesse. Jedoch bedeutet eine heterologe Überexpression von drei Konstrukten für die Zelle enormen Stress. Es stellt sich die Frage, ob die Versuchsergebnisse reproduzierbar, homogen und physiologisch sind. Schon bei den in dieser Arbeit generierten MDCKII-Koexpressions-Zelllinien, die lediglich zwei Konstrukte exprimieren, fällt auf, dass die

Zellen langsamer wachsen, die Morphologie ungleichmäßig ist und die Ergebnisse sehr variabel sind.

Durch die Entschlüsselung der Röntgenkristallstruktur des BEST1-Ionenkanals des Huhns (Kane Dickson et al., 2014) sowie des Bakteriums *Klebsiella pneumoniae* (Yang et al., 2014) kann gezielt der Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die Struktur sowie auf den Schleusenmechanismus des BEST1-Kanals untersucht werden. Zum derzeitigen Zeitpunkt sind lediglich fünf *BEST1* Mutationen beschrieben, die zu dem Krankheitsbild des ADVIRC führen: p.(G83D) (Chen et al., 2016), p.(V86M) (Yardley et al., 2004), p.(V235A) (Burgess et al., 2008), p.(Y236C) (Yardley et al., 2004) und p.(V239M) (Yardley et al., 2004). Räumlich gesehen lokalisieren die Mutationen p.(G83D) und p.(V86M) auf der S2b Helix des BEST1 Proteins, wohingegen sich p.(V235A), p.(Y236C) und p.(V239M) auf der S3b Helix befinden (Miller et al., 2019). Es kann davon ausgegangen werden, dass diese beiden Mutationsgruppen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Kanalfunktion ausüben. Belegend hierfür sind zum ersten, die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse aus dem Halogenidtransport-Assay mit MDCKII-Zellen. Hierbei zeigten Zellen, die die Variante p.(V86M) exprimieren, immer eine leicht höhere Kanalfunktion als Zellen, die die Variante p.(V235A) tragen. Zum zweiten demonstrierten nur diejenigen MDCKII-Zellen, welche die Variante p.(V235A) exprimieren, die pro-Form der lysosomalen Protease CTSD. Bei MDCKII-Zellen, die die Variante p.(V86M) exprimieren, war dies nicht der Fall. Lediglich in hiRPE-Zellen mit der *BEST1* Mutation p.(V86M) war die Vorstufe des Enzyms zu erkennen. Ein Grund dafür könnte sein, dass hier sowohl normales als auch fehlerhaftes Protein vorhanden ist, da auch in den hiRPE-Zellen von gesunden Spendern die pro-Form zu finden ist. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind weitere Versuche mit hiRPE-Zellen, die die anderen ADVIRC-assoziierten *BEST1* Mutation exprimieren, nötig.

Patch-Clamp-Messungen mit HEK293-Zellen, die die ADVIRC-assoziierte Mutation p.(Y236C) exprimieren, resultierten in einem signifikant erhöhten Chlorid-Strom im Vergleich zu HEK293-Zellen, die normales BEST1 exprimieren (Ji et al., 2019b). Eine Begründung liegt möglicherweise darin, dass vermehrt Kanäle in der offenen Konformation vorhanden sind, wie es beispielweise bereits für Formen der Epilepsie beschrieben worden ist (Tang et al., 2016). Diese Hypothese wird unterstützt von Untersuchungen der 3D-Struktur mittels Einzelpartikel-Kryo-Elektronenmikroskopie, die belegen, dass durch die Mutationen p.(Y236C) und p.(W287F) die offene Konformation des BEST1-Kanals bevorzugt wird (Miller et al., 2019).

Durch die erhöhte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität können vermehrt Chlorid-Ionen die Zellmembran passieren. Vermutlich führt dies zu Störungen in der frühen Entwicklung des Auges, wodurch letztendlich der unterschiedliche Phänotyp der autosomal dominanten Bestrophinopathien M. Best und ADVIRC begründet werden kann. Interessant wäre in

weiterführenden Experimenten die Durchführung des Halogenidtransport-Assays oder *Patch-Clamp*-Messungen mit hiRPE-Zelllinien, die nur ein normales bzw. ein mutiertes Allel tragen. Durch einen Allel-spezifischen CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas-protein* 9)-Ansatz könnten solche Zelllinien generiert und untersucht werden und somit noch detaillierte Erkenntnisse zu der Pathologie des M. Best und der ADVIRC gewonnen werden.

Besonders interessant sind zwei *BEST1* Mutationen, die durch einen unterschiedlichen Aminosäureaustausch an derselben Position des Proteins zu einem anderen Phänotyp führen. Die Mutation p.(V235M) resultiert im M. Best (Marquardt et al., 1998), während p.(V235A) zum Krankheitsbild des ADVIRC führt (Burgess et al., 2008). Im Zuge dieser Arbeit wurde in MDCKII-Zellen, die die Varianten p.(V235M) oder p.(V235A) exprimieren, demonstriert, dass das Protein in beiden Zelllinien an der basolateralen Membran lokalisiert ist und bevorzugt über den lysosomalen Degradationsweg abgebaut wird. Im Halogenidtransport-Assay konnte jedoch eindeutig zwischen den beiden Zelllinien differenziert werden. Die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität war infolge der Variante p.(V235A) ähnlich hoch wie in Kontroll-Zellen, wohingegen durch die Variante p.(V235M) die Kanalfunktion deutlich reduziert war.

Weiterführende Studien sind nötig, um zu untersuchen, wie genau sich die Sekundär- und Tertiärstruktur infolge des Aminosäureaustauschs ändert und wie diese letztendlich die Kanalfunktion bzw. den Schleusenmechanismus beeinflussen. Der offensichtlichste Unterschied in den Aminosäuren Alanin (15 kDa) und Methionin (75 kDa) ist die relative Molekülmasse. Denkbar wäre, dass durch das schwerere Methionin, der BEST1-Kanal „geblockt“ und daher der Chlorid-Strom reduziert wird.

Die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität und folglich die Funktion der BEST1-Kanäle stellt einen wichtigen Mechanismus dar, mit welchem *BEST1* Mutationen, die zum autosomal dominanten M. Best oder zur ADVIRC führen, differenziert werden können.

5.2 Klassifizierung der *BEST1* Mutationen

Die Untersuchungen zur molekularen Pathologie der Bestrophinopathien hoben insbesondere drei zelluläre Mechanismen hervor, welche die Entstehung der unterschiedlichen Krankheitsbilder beeinflussen: (i) die Lokalisation des BEST1 Proteins in der Zelle, (ii) der Degradationsweg von fehlerhaftem BEST1 Protein und (iii) der Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität.

Basierend auf diesen Mechanismen können *BEST1* Mutationen in fünf Klassen eingeteilt werden (Klasse I bis Klasse V). Klasse I Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stopcodon,

das vermutlich in einem NMD resultiert. Dadurch wird keine mRNA und folglich kein Protein synthetisiert (z. B. p.(L197PX26)). Bei Klasse II Mutationen wird das Protein nach der Synthese durch den Qualitätskontrollmechanismus der Zelle am ER als fehlerhaft erkannt und dem proteasomalen Degradationsweg zugeführt. Die Folge ist eine reduzierte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität (z. B. p.(R141H) und p.(A195V)). Mutationen der Klassen I und Klasse II führen in homozygoter oder zusammengesetzt-heterozygoter Konstellation zur ARB. Bei Klasse III Mutationen entkommt fehlerhaftes BEST1 Protein dem Qualitätskontrollmechanismus am ER und wird nach Erkennung an einem post-ER Kontrollpunkt über den lysosomalen Degradationsweg abgebaut (z. B. p.(Q238R) und p.(I295del)). BEST1 Protein dieser Klasse erreicht daher nicht die PM und erscheint somit fehllokalisiert im Zytoplasma der Zelle. Dagegen entkommt BEST1 Protein infolge von Klasse IV Mutationen diesem post-ER Qualitätskontrollmechanismus und wird an die basolateralen PM transportiert (z. B. p.(N11K), p.(R218C), p.(V235M) und p.(A243V)). Mutationen der Klassen III und Klasse IV resultieren in einer reduzierten BEST1-vermittelten Membranpermeabilität und führen im heterozygoten Zustand zum Krankheitsbild des autosomal dominanten M. Best. Bei Klasse V Mutationen wird das BEST1 Protein auch an die basolaterale Membran transportiert, jedoch ist eine erhöhte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität gegeben. Mutationen der Klasse V führen im heterozygoten Zustand zum Krankheitsbild des ADVIRC (z. B. p.(V86M), p.(V235A), p.(Y236C) und p.(V239M)) (**Abbildung 29**) (**Tabelle 39**).

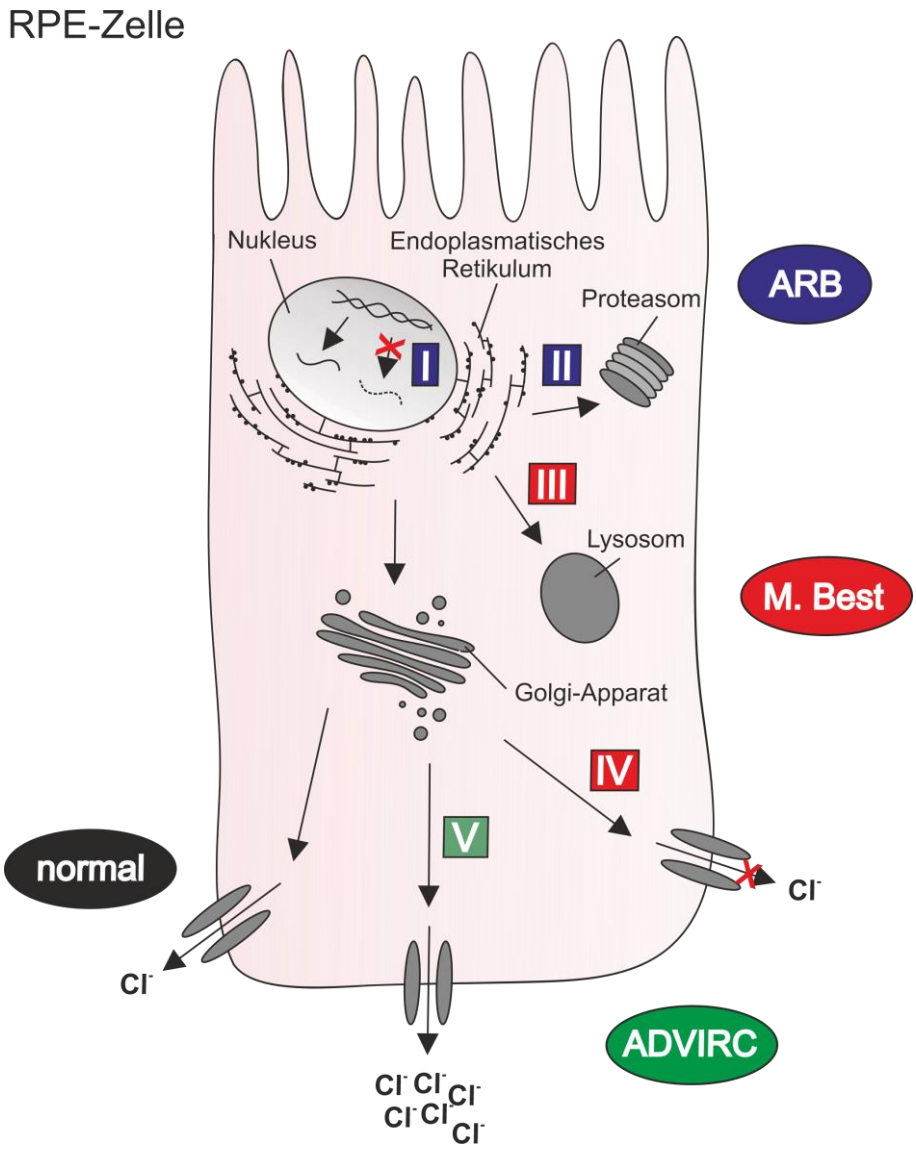


Abbildung 29: Graphische Darstellung der BEST1 Mutationsklassen illustriert an einer Zelle des RPEs. Klasse I Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stopcodon, das vermutlich in einem NMD resultiert. Fehlerhaftes Protein infolge von Klasse II Mutationen wird zur schnellen Degradation dem Proteasom zugeführt. Mutationen der Klassen I und Klasse II führen in homozygoter oder zusammengesetzt-heterozygoter Konstellation zur ARB. Klasse III Mutationen führen zu einer Fehllokalisation von BEST1 im Zytoplasma, wo es dem lysosomalen Abbau unterliegt. Dagegen lokalisiert Protein infolge von Klasse IV Mutationen an der basolateralen Membran, die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität ist jedoch stark reduziert. Mutationen der Klassen III und Klasse IV führen im heterozygoten Zustand zum autosomal dominanten M. Best. Durch Klasse V Mutationen wird Protein zwar auch an die basolaterale Membran transportiert, jedoch liegt eine erhöhte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität vor. Klasse V Mutationen resultieren in heterozygoter Konstellation im Krankheitsbild des ADVIRC. Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (2020).

Tabelle 39: Charakteristika der BEST1 Mutationsklassen

Klasse	Charakteristika
Klasse I	• Vorzeitiges Stopcodon • Keine Detektion von BEST1 Protein • Homozygote oder zusammengesetzt-heterozygote Konstellation führt zur ARB (z. B. p.(L197PX26))
Klasse II	• Basolaterale BEST1 Lokalisation • Synthese von unstabilem BEST1 Protein, das dem proteasomalen Degradationsweg unterliegt • Reduzierte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität • Homozygote oder zusammengesetzt-heterozygote Konstellation führt zur ARB (z. B. p.(R141H) und p.(A195V))
Klasse III	• Fehllokalisation von BEST1 im Zytoplasma • Synthese von unstabilem BEST1 Protein, das dem lysosomalen Degradationsweg unterliegt • Reduzierte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität • Heterozygote Konstellation führt zum autosomal dominanten M. Best (z. B. p.(Q238R) und p.(I295del))
Klasse IV	• Basolaterale BEST1 Lokalisation • Reduzierte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität • Heterozygote Konstellation führt zum autosomal dominanten M. Best (z. B. p.(N11K), p.(R218C), p.(V235M) und p.(A243V))
Klasse V	• Basolaterale BEST1 Lokalisation • Erhöhte BEST1-vermittelte Membranpermeabilität • Heterozygote Konstellation führt zur ADVIRC (z. B. p.(V86M), p.(V235A), p.(Y236C) und p.(V239M))

5.3 Therapeutische Behandlungskonzepte in Abhängigkeit der BEST1 Mutationsklasse

Die Untersuchungen der molekularen Pathomechanismen der Bestrophinopathien und die damit einhergehende Klassifizierung der unterschiedlichen *BEST1* Mutationen ermöglicht es, verschiedene Therapieansätze für die Krankheitsbilder zu betrachten. Grundsätzlich käme zum einen eine medikamentöse Behandlung mit biologisch aktiven Substanzen in Frage. Korrektoren beeinflussen die Faltung von fehllokalisiertem BEST1 und verbessern dadurch den Transport von BEST1 Protein an die basolaterale Membran während Potentiatoren auf eine Verbesserung der Kanalfunktion abzielen. Darüber hinaus ist die Gentherapie mittlerweile Gegenstand vieler Forschungsarbeiten.

Bei der Anwendung von Medikamenten ist zu beachten, dass die BEST1 Mutationsklasse einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Substanz ausübt. So kann beispielsweise ein Potentiator, der das Öffnen des BEST1-Kanals induziert, für Mutationen mit verminderter BEST1-vermittelter Membranpermeabilität (Klasse II bis Klasse IV), eine Verbesserung erzielen, jedoch bei ADVIRC-assoziierten Mutationen (Klasse V) den pathogenen Effekt verstärken. Auf der anderen Seite würden Korrektoren nur bei Mutationen einen Nutzen

haben, infolge derer BEST1 Protein im Zytoplasma fehllokalisiert (Klasse III). Bei Inhibitoren der Proteindegradation ist zu beachten, dass je nach Erbgang – autosomal dominant (Klasse III) oder autosomal rezessiv (Klasse II) – der Abbau in den Proteasomen oder Lysosomen verhindert werden soll. Wobei hierbei die Schwierigkeit eher darin besteht, die Wirkung des Medikaments auf die RPE-Zellen lokal zu begrenzen und schwerwiegende Nebenwirkungen in anderen Zellen und Geweben auszuschließen. Darüber hinaus wären Substanzen, die das Erkennen eines vorzeitigen Stopcodons verhindern und somit einen NMD umgehen, denkbar für ARB-assoziierte Mutationen der Kasse I (nach Milenkovic et al., 2020). Ein Beispiel hierfür ist Altaluren, ein Medikament, das zur Behandlung der Muskeldystrophie Duchenne zugelassen ist (Siddiqui und Sonenberg, 2016).

Dass eine medikamentöse Behandlung durchaus Erfolg hat, zeigten bereits Studien zur autosomal rezessiven Zystischen Fibrose (Mukoviszidose). Diese hat ihren Ursprung in Mutationen im *CFTR* Gen (*Cystis fibrosis transmembrane conductance regulator*), welches für einen Chlorid-Kanal kodiert. Es konnten Korrektoren identifiziert werden, die den Transport von pathogenen CFTR Varianten an die PM begünstigen, sowie Potentiatoren, die den Ionentransport erhöhen (van Goor et al., 2009; Accurso et al., 2010; Iannitti und Palmieri, 2011; Clancy et al., 2012).

Ein natürlich vorkommendes Hundemodell, bei dem die BEST1-assoziierte Erkrankung einem autosomal rezessiven Erbgang folgt, bildet ein attraktives Modell zur Erforschung einer BEST1 Genersatztherapie (Guziewicz et al., 2013). Untersuchungen demonstrierten, dass das Einbringen einer normalen BEST1-Genkopie über Adeno-assoziierte Viren (AAV) in die Augen der Hunde in einer Verbesserung der Sehkraft resultiert (Guziewicz et al., 2018). Allerdings ist auch hier zu vermuten, dass der Therapieerfolg von der BEST1 Mutationsklasse abhängt. Patienten mit zwei Klasse I Mutationen haben vermutlich den größtmöglichen Nutzen der Genersatztherapie, da hier das vollständige Fehlen des Proteins durch Einbringen von zwei völlig intakten BEST1-Genkopien ausgeglichen wird. Dagegen wird bei ARB Patienten, die zusammengesetzt-heterozygot für Mutationen der Klasse I und Klasse II sind, selbst nach einer Genersatztherapie weiterhin fehlerhaftes Protein synthetisiert. Dies führt langfristig zu einer erhöhten Degradation in den Proteasomen, zu einer Beeinträchtigung der ER-Homöostase und letztendlich zu den multiplen vitelliformen Läsionen und einem großen autofluoreszierenden Areal, was charakteristisch für ARB Patienten ist (nach Milenkovic et al., 2020). Denkbar wäre hier eine Kombination von Genersatztherapie (für Klasse I Mutationen) und vorgeschalteter Geninaktivierung durch einen CRISPR/Cas9-Ansatz (für Klasse II Mutationen). Diese sogenannte „Entfernen-und-Ersetzen“-Strategie (*ablate-and-replace strategy*) führte bereits in einem Mausmodell für RP zu einer Verbesserung des Phänotyps (Tsai et al., 2018).

Im Prinzip wäre eine Genersatztherapie auch für die autosomal dominanten Bestrophinopathien M. Best (Klasse III und Klasse IV) und ADVIRC (Klasse V) denkbar. Durch das zusätzliche Einbringen einer normalen BEST1-Genkopie, würde fehlerfreies BEST1 „überexprimiert“ werden. Folglich erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Kanal aus fünf normalen Monomeren zusammensetzt und somit seine Funktion erfüllen kann. Jedoch würde weiterhin fehlerhaftes Protein synthetisiert und bevorzugt über den lysosomalen Degradationsweg abgebaut werden. Langfristig führt auch dies zu einer Ansammlung von Lipofuszin als Abbauprodukt und dessen negativen Folgen für den Patienten (nach Milenkovic et al., 2020).

Sinnvoller wäre das gezielte Entfernen der mutierten BEST1-Genkopie beispielsweise durch einen Allel-spezifischen CRISPR/Cas9-Ansatz. Bei einer autosomal dominanten Erkrankung ist auch eine normale Genkopie vorhanden und folglich wird weiterhin fehlerfreies Protein synthetisiert. Erfolgreich wurde dieser Ansatz bereits im Mausmodell der autosomal dominanten RP durchgeführt (Giannelli et al., 2018). Dass diese Therapie vermutlich eine erhebliche Verbesserung für den Patienten bedeutet, ist an heterozygoten Trägern einer ARB-assoziierten Mutation zu sehen, die in der Regel symptomfrei und funduskopisch unauffällig sind.

Grundsätzlich gibt es mittlerweile vielversprechende Therapieansätze zur Behandlung der Bestrophinopathien. Jedoch sollten die Auswirkungen der verschiedenen pathogenen *BEST1* Mutationen auf zelluläre Prozesse genügend erforscht sein, um eine gezielte und effiziente Behandlung anzustreben.

5.4 Fazit und Ausblick

Eine Besonderheit der Bestrophinopathien ist der Aspekt, dass Mutationen in demselben Gen, *BEST1*, zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die molekulare Pathologie bzw. spezifische Mechanismen zu untersuchen, welche zu der Entstehung der unterschiedlichen Krankheitsbilder beitragen.

Insbesondere mit den Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zellen war es erstmals möglich ein breites Spektrum an *BEST1* Mutationen in einem physiologischen Modellsystem zu untersuchen. Mit MDCKII-Zellen konnte die Anzahl der analysierten Mutationen erweitert und die gewonnenen Resultate aus den hiRPE-Zellen bestätigt werden.

Es wurden drei Mechanismen betrachtet: (i) die Lokalisation des BEST1 Proteins in der Zelle, (ii) der Degradationsweg von fehlerhaftem BEST1 Protein und (iii) der Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die BEST1-vermittelte Membranpermeabilität. Es ergaben sich fünf BEST1

Mutationsklassen: Klasse I und Klasse II resultieren in homozygoter oder zusammengesetzt-heterozygoter Konstellation in ARB, Klasse III und Klasse IV führen in heterozygoter Konstellation zum autosomal dominanten M. Best und Klasse V zum Krankheitsbild des ADVIRC.

Allein von der Position einer Mutation in der BEST1-Kanalstruktur kann nicht eindeutig auf ein Krankheitsbild der Bestrophinopathien geschlossen werden. Durch molekularbiologische Untersuchungen, wie beispielsweise die Bestimmung des Degradationsweges von fehlerhaftem BEST1 Protein, kann nun gezielt geklärt werden, ob es sich um eine autosomal dominante Bestrophinopathie oder die ARB handelt. Dies kann sich als sehr nützlich erweisen in Fällen, bei denen eine ARB beim Patienten vermutet wird, jedoch mittels genetischer Diagnostik keine zweite pathogene Mutation identifiziert werden konnte. Dafür müssen von dem Patienten nicht zwangsläufig hiRPE-Zellen generiert werden, was sehr zeit- und kostenintensiv ist, sondern Experimente im MDCKII-Zellmodell wären hier ausreichend.

In weiterführenden Studien sollte sowohl untersucht werden, welche Chaperone für die korrekte Faltung von BEST1 verantwortlich sind, als auch welche Signalsequenz im BEST1 Protein den Transport an die PM induziert (Sortiersignal). Somit könnte gezielt nach spezifischen pharmakologisch aktiven Substanzen gesucht werden, die diese Prozesse begünstigen. *In silico* Untersuchungen von weiteren ADVIRC-assoziierten *BEST1* Mutationen wären von großem Interesse, um detailliertere Aufschlüsse über den spezifischen Einfluss der Mutation auf die Sekundär- sowie Tertiärstruktur und somit auf den Schleusenmechanismus des Ionenkanals zu erhalten. Die Resultate der vorliegenden Arbeit liefern erste Hinweise, dass insbesondere ADVIRC-assoziierten Mutationen, die im Bereich der TMD2 (p.(G83D) und p.(V86M)) bzw. TMD3 (p.(V235A), p.(Y236C) und p.(V239M)) liegen, einen unterschiedlichen Effekt besitzen. Um darüber hinaus zu demonstrieren, dass das gezielte Entfernen der mutierten BEST1-Genkopie in einer autosomal dominanten Bestrophinopathie den gewünschten Therapieeffekt erzielt, sollten weiterhin hiRPE-Zellen generiert werden, bei welchen das fehlerhafte Allel entfernt worden ist. Mittels Halogenidtransport-Assay oder *Patch-Clamp*-Messungen könnte dann untersucht werden, ob und in welchem Maße die BEST1-Kanalfunktion wiederhergestellt werden kann.

Generell liefert die vorliegende Arbeit grundlegendes Wissen über die Pathologie der Bestrophinopathien und den zugrundeliegenden Pathomechanismen. Es zeigt sich jedoch auch, dass jede *BEST1* Mutation einen spezifischen Effekt auf zelluläre Funktionen ausübt. Daher sollte in Zukunft ein Mutations-abhängiger Therapieansatz gewählt werden, um dem Patienten die bestmögliche Verbesserung der Symptomatik und letztendlich der Lebensqualität zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis

Accurso, F. J.; Rowe, S. M.; Clancy, J. P.; Boyle, M. P.; Dunitz, J. M.; Durie, P. R.; Sagel, S. D.; Hornick, D. B.; Konstan, M. W.; Donaldson, S. H.; Moss, R. B.; Pilewski, J. M.; Rubenstein, R. C.; Uluer, A. Z.; Aitken, M. L.; Freedman, S. D.; Rose, L. M.; Mayer-Hamblett, N.; Dong, Q.; Zha, J.; Stone, A. J.; Olson, E. R.; Ordonez, C. L.; Campbell, P. W.; Ashlock, M. A.; Ramsey, B. W. (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.

Arora, R.; Khan, K.; Kasilian, M. L.; Strauss, R. W.; Holder, G. E.; Robson, A. G.; Thompson, D. A.; Moore, A. T.; Michaelides, M. (2016): Unilateral BEST1-Associated Retinopathy. In: *American Journal of Ophthalmology* 169, S. 24-32.

Ashok, A.; Hegde, R. S. (2009): Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins. In: *PLoS Pathogens* 5 (6), e1000479.

Benjamini, Y.; Hochberg, Y. (1995): Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. In: *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Methodological* 57, S. 289-300.

Best, F. (1905): Über eine hereditäre Maculaaffektion. In: *Ophthalmologica* 13 (3), S. 199-212.

Bindewald, A.; Bird, A. C.; Dandekar, S. S.; Dolar-Szczasny, J.; Dreyhaupt, J.; Fitzke, F. W.; Einbock, W.; Holz, F. G.; Jorzik, J. J.; Keilhauer, C.; Lois, N.; Mlynski, J.; Pauleikhoff, D.; Staurenghi, G.; Wolf, S. (2005): Classification of fundus autofluorescence patterns in early age-related macular disease. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 46 (9), S. 3309-3314.

Bitner, H.; Schatz, P.; Mizrahi-Meissonnier, L.; Sharon, D.; Rosenberg, T. (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.

Boon, C. J. F.; Klevering, B. J.; Leroy, B. P.; Hoyng, C. B.; Keunen, J. E. E.; den Hollander, A. I. (2009): The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (3), S. 187-205.

Brandl, C.; Grassmann, F.; Riolfi, J.; Weber, B. H. F. (2015): Tapping Stem Cells to Target AMD. Challenges and Prospects. In: *Journal of Clinical Medicine* 4 (2), S. 282-303.

Brandl, C.; Zimmermann, S. J.; Milenkovic, V. M.; Rosendahl, S. M. G.; Grassmann, F.; Milenkovic, A.; Hehr, U.; Federlin, M.; Wetzel, C. H.; Helbig, H.; Weber, B. H. F. (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.

Burgess, R.; Millar, I. D.; Leroy, B. P.; Urquhart, J. E.; Fearon, I. M.; Baere, E. de; Brown, P. D.; Robson, A. G.; Wright, G. A.; Kestelyn, P.; Holder, Graham E.; Webster, A. R.; Manson, F. D. C.; Black, G. C. M. (2008): Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. In: *American Journal of Human Genetics* 82 (1), S. 19-31.

Carter, D. A.; Smart, M. J. K.; Letton, W. V. G.; Ramsden, C. M.; Nommiste, B.; Chen, L. L.; Fynes, K.; Muthiah, M. N.; Goh, P.; Lane, A.; Powner, M. B.; Webster, A. R.; da Cruz, L.; Moore, A. T.; Coffey, P. J.; Carr, A.-J. F. (2016): Mislocalisation of BEST1 in iPSC-derived retinal pigment epithelial cells from a family with autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC). In: *Scientific Reports* 6, S. 33792-33805.

Chang, A.; Fink, G. R. (1995): Targeting of the yeast plasma membrane H+ATPase: a novel gene AST1 prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole. In: *The Journal of cell biology* 128 (1-2), S. 39-49.

Chen, C. J.; Kaufman, S.; Packo, K; Stöhr, H.; Weber, B. H. F.; Goldberg, M. F. (2016): Long-Term Macular Changes in the First Proband of Autosomal Dominant Vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC) Due to a Newly Identified Mutation in BEST1. In: *Ophthalmic Genetics* 37 (1), S. 102-108.

Chen, S.; Einspanier, R.; Schoen, J. (2015): Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. In: *Histochemistry and Cell Biology* 144 (5), S. 509-515.

Ciulla, T. A.; Frederick, A. R. (1997): Acute Progressive Multifocal Best's Disease in a 61 - year-old Man. In: *American Journal of Ophthalmology* 123 (1), S. 129-131.

Clancy, J. P.; Rowe, S. M.; Accurso, F. J.; Aitken, M. L.; Amin, R. S.; Ashlock, M. A.; Ballmann, M.; Boyle, M. P.; Bronsveld, I.; Campbell, P. W.; Boeck, K. de; Donaldson, S. H.; Dorkin, H. L.; Dunitz, J. M.; Durie, P. R.; Jain, M.; Leonard, A.; McCoy, K. S.; Moss, R. B.; Pilewski, J. M.; Rosenbluth, D. B.; Rubenstein, R. C.; Schter, M. S.; Botfield, M.; Ordonez, C. L.; Spencer-Green, G. T.; Vernillet, L.; Wisseh, S. Yen, K.; Konstan, M. W. (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.

Coughlan, C. M.; Walker, J. L.; Cochran, J. C.; Wittrup, K. D.; Brodsky, J. L. (2004): Degradation of mutated bovine pancreatic trypsin inhibitor in the yeast vacuole suggests post-endoplasmic reticulum protein quality control. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (15), S. 15289-15297.

Cross, H. E.; Bard, L. (1974): Electro-oculography in Best's macular dystrophy. In: *American Journal of Ophthalmology* 77 (1), S. 46-50.

Cui, C. Y.; Childress, V.; Piao, Y.; Michel, M.; Johnson, A. A.; Kunisada, M.; Ko, M. S. (2012): Forkhead transcription factor FoxA1 regulates sweat secretion through Bestrophin 2 anion channel and Na-K-Cl cotransporter 1. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, S. 1199-1203.

Dalvi, S.; Galloway, C. A.; Winschel, L.; Hashim, A.; Soto, C.; Tang, C.; MacDonald, L. A.; Singh, R. (2019): Environmental stress impairs photoreceptor outer segment (POS) phagocytosis and degradation and induces autofluorescent material accumulation in hiPSC-RPE cells. In: *Cell Death Discovery* 5, S. 96-112.

Dalvin, L. A.; Pulido, J. S.; Marmorstein, A. D. (2017): Vitelliform dystrophies: Prevalence in Olmsted County, Minnesota, United States. In: *Ophthalmic Genetics* 38 (2), S. 143-147.

Davidson, A. E.; Millar, I. D.; Burgess-Mullan, R.; Maher, G. J.; Urquhart, J. E.; Brown, P. D.; Black, G. C. M.; Manson, F. D. C. (2011): Functional characterization of bestrophin-1 missense mutations associated with autosomal recessive bestrophinopathy. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 52 (6), S. 3730-3736.

Davidson, A. E.; Millar, I. D.; Urquhart, J. E.; Burgess-Mullan, R.; Shweikh, Y.; Parry, N.; O'Sullivan, J.; Maher, G. J.; McKibbin, M.; Downes, S. M.; Lotery, A. J.; Jacobson, S. G.; Brown, P. D.; Black, G. C. M.; Manson, F. D. C. (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.

DePedro, H. M.; Urayama, P. (2009): Using LysoSensor Yellow/Blue DND-160 to sense acidic pH under high hydrostatic pressures. In: *Analytical Biochemistry* 384 (2), S. 359-361.

Duncan, L. M.; Piper, S.; Dodd, R. B.; Saville, M. K.; Sanderson, C. M.; Luzio, J. P.; Lehner, P. J. (2006): Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. In: *The EMBO Journal* 25 (8), S. 1635-1645.

Esteve-Rudd, J.; Hazim, R. A.; Diemer, T.; Paniagua, A. E.; Volland, S.; Umapathy, A.; Williams, D. S. (2018): Defective phagosome motility and degradation in cell nonautonomous RPE pathogenesis of a dominant macular degeneration. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (21), S. 5468-5473.

Fields, M. A.; Bowrey, H. E.; Gong, J.; Ablonczy, Z.; v. d. Priore, L. (2015): Retinoid Processing in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cultures. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 134, S. 477-490.

Fung, A. T.; Yzer, S.; Goldberg, N.; Wang, H.; Nissen, M.; Giovannini, A.; Merriam, J. E.; Bukanova, E. N.; Cai, C.; Yannuzzi, L. A.; Tsang, S. H.; Allikmets, R. (2015): New best1 mutations in autosomal recessive bestrophinopathy. In: *Retina* 35 (4), S. 773-782.

Galietta, L. V.; Haggie, P. M.; Verkman, A. S. (2001): Green fluorescent protein based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. In: *FEBS Letters* (499), S. 220-224.

Giannelli, S. G.; Luoni, M.; Castoldi, V.; Massimino, L.; Cabassi, T.; Angeloni, D.; Demontis, G. C.; Leocani, L.; Andreazzoli, M.; Broccoli, V. (2018): Cas9/sgRNA selective targeting of the P23H Rhodopsin mutant allele for treating retinitis pigmentosa by intravitreal AAV9.PHP.B-based delivery. In: *Histochemistry and Cell Biology* 27 (5), S. 761-779.

Gieselmann, V.; Hasilik, A.; Figura, K. von (1985): Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. In: *The Journal of Biological Chemistry* 260 (5), S. 3215-3220.

Gouras, P.; Braun, K.; Ivert, L.; Neuringer, M.; Mattison, J. A. (2009): Bestrophin detected in the basal membrane of the retinal epithelium and drusen of monkeys with drusenoid maculopathy. In: *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 247 (8), S. 1051-1056.

Grisanti, S.; Guidry, C. (1995): Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 36 (2), S. 391-405.

Guziewicz, K. E.; Aguirre, G. D.; Zangerl, B. (2012): Modeling the structural consequences of BEST1 missense mutations. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 723, S. 611-618.

Guziewicz, K. E.; Cideciyan, A. V.; Beltran, W. A.; Komáromy, A. M.; Dufour, V. L.; Swider, M.; Iwabe, S.; Sumaroka, A.; Kendrick, B. T.; Ruthel, G.; Chiodo, V. A.; Heon, E.; Hauswirth, W. W.; Jacobson, S. G.; Aguirre, G. D. (2018): BEST1 gene therapy corrects a diffuse retina-wide microdetachment modulated by light exposure. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (12), E2839-E2848.

Guziewicz, K. E.; Slavik, J.; Lindauer, S. J. P.; Aguirre, G. D.; Zangerl, B. (2011): Molecular consequences of BEST1 gene mutations in canine multifocal retinopathy predict functional implications for human bestrophinopathies. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 52 (7), S. 4497-4505.

Guziewicz, K. E.; Zangerl, B.; Komáromy, A. M.; Iwabe, S.; Chiodo, V. A.; Boye, S. L.; Hauswirth, W. W.; Beltran, W. A.; Aguirre, G. D. (2013): Recombinant AAV-mediated BEST1 transfer to the retinal pigment epithelium: analysis of serotype-dependent retinal effects. In: *PLOS ONE* 8 (10), e75666.

Hartzell, C. H.; Qu, Z. Q.; Yu, K.; Xiao, Q.; Chien, L.-T. (2008): Molecular physiology of bestrophins. Multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. In: *Physiological Reviews* 88 (2), S. 639-672.

Hurwitz, S. J.; Terashima, M.; Mizunuma, N.; Slapak, C. A. (1997): Vesicular anthracycline accumulation in doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes. In: *Blood* 89 (10), S. 3745-3754.

Iannitti, T.; Palmieri, B. (2011): Clinical and Experimental Applications of Sodium Phenylbutyrate. In: *Drugs in R&D* 11 (3), S. 227-249.

Jayaraman, S.; Haggie, P. M.; 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.

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-C1018.

Jentsch, T. J.; Poët, M.; Fuhrmann, J. C.; Zdebik, A. 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.

Ji, C.; Kittredge, A.; Hopiavuori, A.; Ward, N.; Chen, S.; Fukuda, Y.; Zhang, Y.; Yang, T. (2019a): Dual Ca2+-dependent gates in human Bestrophin1 underlie disease-causing mechanisms of gain-of-function mutations. In: *Communications Biology* 2, S. 240-253.

Ji, C.; Li, Y.; Kittredge, A.; Hopiavuori, A.; Ward, N.; Yao, P.; Fukuda, Y.; Zhang, Y.; Tsang, S. H.; Yang, T. (2019b): Investigation and Restoration of BEST1 Activity in Patient-derived RPEs with Dominant Mutations. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 19026-19039.

Johnson, A. A.; Bachman, L. A.; Gilles, B. J.; Cross, S. D.; Stelzig, K. E.; Resch, Z. T.; Marmorstein, L. Y.; Pulido, J. S.; Marmorstein, A. D. (2015): Autosomal Recessive Bestrophinopathy Is Not Associated With the Loss of Bestrophin-1 Anion Channel Function in a Patient With a Novel BEST1 Mutation. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 56 (8), S. 4619-4630.

Johnson, A. A.; Lee, Y.-S.; Chadburn, A. J.; Tammaro, P.; Manson, F. D.; Marmorstein, L. Y.; Marmorstein, A. 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.

Johnson, A. A.; Lee, Y.-S.; Stanton, J. B.; Yu, K.; Hartzell, C. H.; Marmorstein, L. Y.; Marmorstein, A. D. (2013): Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. In: *Human Molecular Genetics* 22 (23), S. 4688-4697.

Kaden, T. R.; Tan, A. C. S.; Feiner, L.; Freund, K. B. (2017): Unilateral Best Disease: A Case Report. In: *Retinal Cases & Brief Reports* 11 Suppl 1, S191-S196.

Kanaujiya, J.; Bastow, E.; Luxmi, R.; Hao, Z.; Zattas, D.; Hochstrasser, M.; Reichenberger, E. J.; Chen, I.-P. (2018): Rapid degradation of progressive ankylosis protein (ANKH) in craniometaphyseal dysplasia. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 15710-15723.

Kane Dickson, V.; Pedi, L.; Long, S. B. (2014): Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel. In: *Nature* 516 (7530), S. 213-218.

Kaufman, S. J.; Goldberg, M. F.; Orth, D. H.; Fishman, G. A.; Tessler, H.; Mizuno, K. (1982): Autosomal Dominant Vitreoretinochoroidopathy. In: *Archives of Ophthalmology* 100 (2), S. 272-278.

Keeling, E.; Lotery, A. J.; Tumbarello, D. A.; Ratnayaka, J. A. (2018): Impaired Cargo Clearance in the Retinal Pigment Epithelium (RPE) Underlies Irreversible Blinding Diseases. In: *Cells* 7 (2) S. 16-35.

Kellner, S.; Stöhr, H.; Fiebig, B.; Weinitz, S.; Farmand, G.; Kellner, U.; Weber, B. H. F. (2016): Fundus Autofluorescence and SD-OCT Document Rapid Progression in Autosomal

Dominant Vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC) Associated with a c.256G A Mutation in BEST1. In: *Ophthalmic Genetics* 37 (2), S. 201-208.

Kellner, U.; Renner, A. B.; Herbst, S. M.; Kellner, S.; Weinitz, S.; Weber, B. H. F. (2012): Hereditäre Netzhautdystophien. In: *Klinischen Monatsblätter für Augenheilkunde* 229 (2), S. 171-196.

Khan, K. N.; Islam, F.; Holderm G.; Robson, A.; Webster, A. R.; Moore, A. T.; Michaelides, M. (2018a): Normal Electrooculography in Best Disease and Autosomal Recessive Bestrophinopathy. In: *Retina* (38), S. 379-386.

Khan, K. N.; Islam, F.; Moore, A. T.; Michaelides, M. (2018b): The Fundus Phenotype associated with the p.Ala243Val BEST1 Mutation. In: *Retina* 38 (3), S. 606-613.

Kintaka, R.; Makanae, K.; Moriya, H. (2016): Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes. In: *Scientific Reports* 6, S. 31774-31485.

Krämer, F.; White, K.; Pauleikhoff, D.; Gehrig, A.; Passmore, L.; Rivera, A.; Rudolph, G.; Kellner, U.; Andrassi, M.; Lorenz, B.; Rohrschneider, K.; Blankenagel, A.; Jurklies, B.; Schilling, H.; Schutt, F.; Holz, F. G.; Weber, B. H. F. (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: *EJHG: European Journal of Human Genetics* 8 (4), S. 286-292.

Lacassagne, E.; Dhuez, A.; Rigaudière, F.; Dansault, A.; Vêtu, C.; Bigot, K.; Vieira, V.; Puech, B.; Defoort-Dhellemmes, S.; Abitbol, M. (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.

Laird, P. W.; Zijderved, A.; Linders, K.; Rudnicki, M. A.; Jaenisch, R.; Berns, A. (1991): Simplified mammalian DNA isolation procedure. In: *Nucleic Acids Research* 19 (15), S. 4293.

Li, Y.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Kittredge, A.; Ward, N.; Chen, S.; Tsang, S. H.; Yang, T. (2017): Patient-specific mutations impair BESTROPHIN1's essential role in mediating Ca2+-dependent Cl- currents in human RPE. In: *eLife* 6, e29914.

Lin, B.; Cai, X.-B.; Zheng, Z.-L.; Huang, X.-F.; Liu, X.-L.; Qu, J.; Jin, Z.-B. (2016): Clinical and genetic analyses reveal novel pathogenic ABCA4 mutations in Stargardt disease families. In: *Scientific Reports* 6, S. 35414-35421.

Liu, J.; Lu, W.; Reigada, D.; Nguyen, J.; Laties, A. M.; Mitchell, C. H. (2008): Restoration of lysosomal pH in RPE cells from cultured human and ABCA4(-/-) mice: pharmacologic approaches and functional recovery. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 49 (2), S. 772-780.

Lueck, K.; Hennig, M.; Lommatzsch, A.; Pauleikhoff, D.; Wasmuth, S. (2012): Complement and UV-irradiated photoreceptor outer segments increase the cytokine secretion by retinal pigment epithelial cells. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 53 (3), S. 1406-1413.

Lukovic, D.; Artero C., A.; Delgado, A. B. G.; Bernal, M. de los A. M.; Luna P. N.; Díez Lloret, A.; Perez Espejo, R.; Kamenarova, K.; Fernández Sánchez, L.; Cuenca, N.; Cortón, M.; Avila, F. A.; Sorkio, A.; Skottman, H.; Ayuso, C.; Erceg, S.; Bhattacharya, S. S. (2015): Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. In: *Scientific Reports* 5, S. 12910-12921.

Marmorstein, A. D.; Cross, H. E.; Peachey, N. S. (2009): Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (3), S. 206-226.

Marmorstein, A. D.; Johnson, A. A.; Bachman, L. A.; Andrews-Pfannkoch, C.; Knudsen, T.; Gilles, B. J.; Hill, M.; Gandhi, J. K.; Marmorstein, L. Y.; Pulido, J. S. (2018): Mutant

Best1 Expression and Impaired Phagocytosis in an iPSC Model of Autosomal Recessive Bestrophinopathy. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 4487-4491.

Marmorstein, A. D.; Kinnick, T. R.; Stanton, J. B.; Johnson, A. A.; Lynch, R. M.; Marmorstein, L. Y. (2015): Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca2+ signaling in human retinal pigment epithelium. In: *Molecular Vision* 21, S. 347-359.

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: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23), S. 12758-12763.

Marmorstein, A. D.; Stanton, J. B.; Yocom, J.; Bakall, B.; Schiavone, M. T.; Wadelius, C.; Marmorstein, L. Y.; Peachey, N. S. (2004): A model of best vitelliform macular dystrophy in rats. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 45 (10), S. 3733-3742.

Marmorstein, L. Y.; Wu, J.; McLaughlin, P. J.; Yocom, J.; Karl, M. O.; Neussert, R.; Wimmers, S.; Stanton, J. B.; Gregg, R. G.; Strauss, O.; Peachey, N. S.; Marmorstein, A. D. (2006): The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1). In: *The Journal of General Physiology* 127 (5), S. 577-589.

Marquardt, A.; Stöhr, H.; Passmore, L. A.; Krämer, F.; Rivera, A.; Weber, B. H. F. (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.

Michaelides, M.; Urquhart, J.; Holder, G. E.; Restori, M.; Kayali, N.; Manson, F. D. C.; Black, G. C. M. (2006): Evidence of genetic heterogeneity in MRCS (microcornea, rod-cone dystrophy, cataract, and posterior staphyloma) syndrome. In: *American Journal of Ophthalmology* 141, S. 418-420.

Milenkovic, A.; Brandl, C.; Milenkovic, V. M.; Jendryke, T.; Sirianant, L.; Wanitchakool, P.; Zimmermann, S. J.; Reiff, C. M.; Horling, F.; Schrewe, H.; Schreiber, R.; Kunzelmann, K.; Wetzel, C. H.; Weber, B. H. F. (2015): Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (20), E2630-E2639.

Milenkovic, A.; Brandl, C.; Nachtigal, A.-L.; Kellner, U.; Weber, B. H. F. (2020): Mutationsabhängige Mechanismen und deren Bedeutung für zielgerichtete Behandlungsstrategien am Beispiel von Bestrophin 1 und den Bestrophinopathien. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 237 (3), S. 259-266.

Milenkovic, A.; Milenkovic, V. M.; Wetzel, C. H.; Weber, B. 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.

Milenkovic, A.; Schmied, D.; Tanimoto, N.; Seeliger, M. W.; Sparrow, J. R.; Weber, B. 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).

Milenkovic, V. M.; Langmann, T.; Schreiber, R.; Kunzelmann, K.; Weber, B. H. F. (2008): Molecular evolution and functional divergence of the bestrophin protein family. In: *BMC Evolutionary Biology* 8 (72).

Milenkovic, V. M.; Rohrl, E.; Weber, B. H. F.; Strauss, O. (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.

Miller, A. N.; Vaisey, G.; Long, S. B. (2019): Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin. In: *eLife* 8, e43231.

Mohler, C. W.; Fine, S. L. (1981): Long-term Evaluation of Patients with Best's Vitelliform Dystrophy. In: *Ophthalmology* 88 (7), S. 688-692.

Moshfegh, Y.; Velez, G.; Li, Y.; Bassuk, A. G.; Mahajan, V. B.; Tsang, S. H. (2016): BESTROPHIN1 mutations cause defective chloride conductance in patient stem cell-derived RPE. In: *Human Molecular Genetics* 25 (13), S. 2672-2680.

Mullins, R. F.; Kuehn, M. H.; Faidley, E. A.; Syed, N. A.; Stone, E. M. (2007): Differential macular and peripheral expression of bestrophin in human eyes and its implication for best disease. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 48 (7), S. 3372-3380.

Nachtigal, A.-L.; Milenkovic, A.; Brandl, C.; Schulz, H. L.; Duerr, L. M. J.; Lang, G. E.; Reiff, C.; Herrmann, P.; Kellner, U.; Weber, B. H. F. (2020): Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5), S. 1597-1617.

Nordström, S. (1974): Hereditary macular degeneration – a population survey in the country of Vsterbotten, Sweden. In: *Hereditas* 78 (1), S. 41-62.

Ogle, D. H.; Wheeler, P.; Dinno, A. (2019): FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.8.25.

Pedemonte, N.; Galietta, L. J. V. (2012): Pharmacological Correctors of Mutant CFTR Mistrafficking. In: *Frontiers in Pharmacology* 3 (175).

Petrukhin, K.; Koisti, M. J.; Bakall, B.; Li, W.; Xie, G.; Marknell, T.; Sandgren, O.; Forsman, K.; Holmgren, G.; Andreasson, S.; Vujic, M.; Bergen, A. A. B.; McGarty-Dugan, V.; Figueroa, D.; Austin, C. P.; Metzker, M. L.; Caskey, C. T.; Wadelius, C. (1998): Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. In: *Nature Genetics* 19 (3), S. 241-247.

Pollack, K.; Kreuz, F. R.; Pillunat, L. E. (2005): Morbus Best mit normalem EOG. Fallvorstellung einer familiären Makuladystrophie. In: *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 102 (9), S. 891-894.

Pollard, K. S.; Dudoit, S.; van der Laan, M. J. (2005): Multiple Testing Procedures: The Multitest Package and Applications to Genomics. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor,* Springer, Kapitel 15, S. 249-271.

Powers, E. T.; Morimoto, R. I.; Dillin, A.; Kelly, J. W.; Balch, W. E. (2009): Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. In: *Annual Review of Biochemistry* 78, S. 959-991.

R Core Team (2018): R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.

Ramsden, C. M.; Nommiste, B.; Lane, A.; Carr, A.-J. F.; Powner, M. B.; Smart, M.; Chen, L. L.; Muthiah, M. N.; Webster, A. R.; Moore, A. T.; Cheetham, M. E.; da Cruz, L.; C., Peter J. (2017): Rescue of the MERTK phagocytic defect in a human iPSC disease model using translational read-through inducing drugs. In: *Scientific Reports* 7 (1), 51-60.

Renner, A. B.; Tillack, H.; Kraus, H.; Krämer, F.; Mohr, N.; Weber, B. H. F.; Foerster, M. H.; Kellner, U. (2005): Late onset is common in best macular dystrophy associated with VMD2 gene mutations. In: *Ophthalmology* 112 (4), S. 586-592.

Rizzolo, L. J. (2014): Barrier Properties of Cultured Retinal Pigment Epithelium. In: *Experimental Eye Research* 126, S. 16-26.

Schaaf, C.; Zschocke, J. (2013): Pathomechanismen genetischer Krankheiten. In: *Basiswissen Humangenetik* Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg.

Siddiqui, N.; Sonenberg, N. (2016): Proposing a mechanism of action for ataluren. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (44), S. 12353-12355.

Singh, R.; Kuai, D.; Guziewicz, K. E.; Meyer, J.; Wilson, M.; Lu, J.; Smith, M.; Clark, E.; Verhoeven, A.; Aguirre, G. D.; Galloway, C. A. (2015): Pharmacological Modulation of Photoreceptor Outer Segment Degradation in a Human iPS Cell Model of Inherited Macular Degeneration. In: *Molecular Therapy* 23 (11), S. 1700-1711.

Singh, R.; Phillips, M. J.; Kuai, D.; Meyer, J.; Martin, J. M.; Smith, M. A.; Perez, E. T.; Shen, W.; Wallace, K. A.; Capowski, E. E.; Wright, L. S.; Gamm, D. M. (2013a): Functional Analysis of Serially Expanded Human iPS Cell-Derived RPE Cultures. In: *Retinal Cell Biology* (54), S. 6767-6778.

Singh, R.; Shen, W.; Kuai, D.; Martin, J. M.; Guo, X.; Smith, M. A.; Perez, E. T.; Phillips, M. J.; Simonett, J. M.; Wallace, K. A.; Verhoeven, A. D.; Capowski, E. E.; Zhang, X.; Yin, Y.; Halbach, P. J.; Fishman, G. A.; Wright, L. S.; Pattnaik, B. R.; Gamm, D. M. (2013b): iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. In: *Human Molecular Genetics* 22 (3), S. 593-607.

Sparrow, J. R.; Boulton, M. (2005): RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. In: *Experimental Eye Research* 80 (5), S. 595–606.

Srinivasan, B.; Kolli, A. R.; Esch, M. B.; Abaci, H. E.; Shuler, M. L.; Hickman, J. J. (2015): TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. In: *Journal of Laboratory Automation* 20 (2), S. 107-126.

Stöhr, H.; Marquardt, A.; Nanda, I.; Schmid, M.; Weber, B. H. F. (2002): Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. In: *EJHG: European Journal of Human Genetics* 10 (4), S. 281-284.

Strauss, O. (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological Reviews* 85 (3), S. 845-881.

Sun, H.; Tsunenari, T.; You, K.-W.; Nathans, J. (2002): The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6), S. 4008-4013.

Sun, Z.; Brodsky, J. L. (2018): The degradation pathway of a model misfolded protein is determined by aggregation propensity. In: *Molecular Biology of the Cell* 29 (12), S. 1422-1434.

Sussman, J. J.; Bonifacino, J. S.; Lippincott-Schwartz, J.; Weissman, A. M.; Saito, T.; Klausner, R. D.; Ashwell, J. D. (1988): Failure to synthesize the T Cell CD3-zeta chain: Structure and function of a partial T cell receptor complex. In: *Cell* 52 (1), S. 85-95.

Suzuki, M.; Morita, T.; Iwamoto, T. (2006): Diversity of Cl(-) channels. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (1), S. 12-24.

Tang, Q.-Y.; Zhang, F.-F.; Xu, J.; Wang, R.; Chen, J.; Logothetis, D. E.; Zhang, Z. (2016): Epilepsy-Related Slack Channel Mutants Lead to Channel Over-Activity by Two Different Mechanisms. In: *Cell Reports* 14 (1), S. 129-139.

Tsai, Y.-T.; Wu, W.-H.; Lee, T.-T.; Wu, W.-P.; Xu, C. L.; Park, K. S.; Cui, X.; Justus, S.; Lin, C.-S.; Jauregui, R.; Su, P.-Y.; Tsang, S. H. (2018): Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Based Genome Surgery for the Treatment of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. In: *Ophthalmology* 125 (9), S. 1421-1430.

Turk, B.; Dolenc, I.; Lenarcic, B.; Krizaj, I.; Turk, V.; Bieth, J. G.; Björk, I. (1999): Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. In: *European Journal of Biochemistry* 259 (3), S. 926-932.

Uggenti, C.; Briant, K.; Streit, A.-K.; Thomson, S.; Koay, Y. H.; Baines, R. A.; Swanton, E.; Manson, F. D. (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.

Vaisey, G.; Miller, A. N.; Long, S. B. (2016): Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the bestrophin ion channel. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (47), E7399-E7408.

van Goor, F.; Hadida, S.; Grootenhuis, P. D. J.; Burton, B.; Cao, D.; Neuberger, T.; Turnbull, A.; Singh, A.; Joubran, J.; Hazlewood, A.; Zhou, J.; McCartney, J.; Arumugam, V.; Decker, C.; Yang, J.; Young, C.; Olson, E. R.; Wine, J. J.; Frizeell, R. A.; Ashlock, M.; Negulescu, P. (2009): Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. In: *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44), S. 18825-18830.

Vanslyke, J. K.; Naus, C. C.; Musil, L. S. (2009): Conformational maturation and post-ER multisubunit assembly of gap junction proteins. In: *Molecular Biology of the Cell* 20 (9), S. 2451-2463.

Varghese, B.; Barriere, H.; Carbone, C. J.; Banerjee, A.; Swaminathan, G.; Plotnikov, A.; Xu, P.; Peng, J.; Goffin, V.; Lukacs, G. L.; Fuchs, S. Y. (2008): Polyubiquitination of prolactin receptor stimulates its internalization, postinternalization sorting, and degradation via the lysosomal pathway. In: *Molecular and Cellular Biology* 28 (17), S. 5275-5287.

Wang, S.; Ng, D. T. W. (2010): Evasion of endoplasmic reticulum surveillance makes Wsc1p an obligate substrate of Golgi quality control. In: *Molecular Biology of the Cell* 21 (7), S. 1153-1165.

Wang, X.; Robbins, J. (2014): Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 71, S. 16-24.

Wang, Z. V.; Deng, Y.; Gao, N.; Pedrozo, Z.; Li, D. L.; Morales, C. R.; Criollo, A.; Luo, X.; Tan, W.; Jiang, N.; Lehrman, M. A.; Rothermel, B. A.; Lee, A.-H.; Lavandero, Se.; Mammen, P. P. A.; Ferdous, A.; Gillette, T. G.; Scherer, P. E.; Hill, J. A. (2014): Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. In: *Cell* 156 (6), S. 1179-1192.

Wiedemann, P. M.; Simon, J.; Schicktanz, S.; Tannert, C. (2004): The future of stem-cell research in Germany. In: *EMBO reports* 5 (10), S. 927-931.

Wong, R. L. M.; Hou, P.; Choy, K.-W.; Chiang, S. W. Y.; Tam, P. O. S.; Li, H.; Chan, W.-M.; Lam, D. S. C.; Pang, C.-P.; Lai, T. Y. Y. (2010): Novel and homozygous BEST1 mutations in Chinese patients with Best vitelliform macular dystrophy. In: *Retina* 30 (5), S. 820-827.

Xiao, Q.; Hartzell, C. H.; Yu, K. (2010): Bestrophins and retinopathies. In: *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 460 (2), S. 559-569.

Yang, T.; Liu, Q.; Kloss, B.; Bruni, R.; Kalathur, R. C.; Guo, Y.; Kloppmann, E.; Rost, B.; Colecraft, H. M.; Hendrickson, W. A. (2014): Structure and Selectivity in Bestrophin Ion Channels. In: *Science* 346 (6207), S. 355-359.

Yardley, J.; Leroy, B. P.; Hart-Holden, N.; Lafaut, B. A.; Loeys, B.; Messiaen, L. M.; Perveen, R.; Reddy, M. A.; Bhattacharya, S. S.; Traboulsi, E.; Baralle, D.; Laey, J.-J. de; Puech, B.; Kestelyn, P.; Moore, A. T.; Manson, F. D. C.; Black, G. C. M. (2004): Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC). In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 45 (10), S. 3683-3689.

Yu, K.; Cui, Y.; Hartzell, C. H. (2006): The bestrophin mutation A243V, linked to adult-onset vitelliform macular dystrophy, impairs its chloride channel function. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 47 (11), S. 4956-4961.

Zhang, Y.; Davidson, B. R.; Stamer, W. D.; Barton, J. K.; Marmorstein, L. Y. (2009): Enhanced inflow and outflow rates despite lower IOP in bestrophin-2-deficient mice. In: *Investigative Opthalmology & Visual Science* 50, S. 765-770.

Zhang, Y.; Stanton, J. B.; Wu, J.; Yu, K.; Hartzell, C. H.; Peachey, N. S.; Marmorstein, L. Y.; Marmorstein, A. D. (2010): Suppression of Ca2+ signaling in a mouse model of Best disease. In: *Human Molecular Genetics* 19 (6), S. 1108-1118.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µ	mikro
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AAP	*α1-antitrypsin protein*, α1-Antitrypsin
AAV	Adeno-assoziierte Viren
ACTB	β-Aktin
ADVIRC	Autosomal Dominante Vitreoretinochoroidopathie
AMD	Altersbedingten Makula-Degeneration
ARB	Autosomal Rezessive Bestrophinopathie
BEST1	Bestrophin 1
bp	Basenpaar
BVMD	Best'sche vitelliforme Makuladystrophie
cDNA	*complementary* DNA, komplementäre DNA
CFP	*color fundus images*, Farb-Fundusaufnahmen
CFTR	*cystis fibrosis transmembrane conductance regulator*
CHX	Cycloheximid
CQ	Chloroquin
CRISPR/Cas9	*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas-protein* 9
CTNNB1	β-Catenin
CTSD	Cathepsin D
Cx43	Connexin 43
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	*Deoxyribonucleicacid*, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOG	*electrooculogram*, Elektrookulogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	*endoplasmic reticulum-associated degradation*, ER-assoziierte Degradation
et al.	et aliter, und andere
Exo	Exonuklease
FAF	*fundus autofluorescence*, Fundusautofluoreszenz
FBS	*fetal bovine serum*
fhRPE	fetales humanes RPE
g	Gramm
gDNA	genomischen DNA
GFR	*growth factor reduced*
GJA1	*gap junction alpha-1 protein*
h	Stunde
HEK293	*human embryonic kidney 293*
hiPSC	*human induced pluripotent stem cells*, humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiRPE-Zellen	RPE-Zellen abgeleitet aus humanen induziert pluripotenten Stammzellen
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IN	Intrazellulär
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton

l	Liter
m	milli
M	Molar
M. Best	Morbus Best
mAB	monoklonaler Antikörper
MDCKII-Zellen	*Madin-Darby Canine Kidney* II-Zellen
min	Minute
MM	Mastermix
MRCS-Syndrom	Mikrokornea – Zapfen-Stäbchen-Dystrophie – Katarakt – posteriores Staphylom
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
n	nano
NIA	*near infrared autofluorescence*, Nah-Infrarot-Autofluoreszenz
NMD	*nonsene-mediated mRNA decay*
pAB	polyklonaler Antikörper
PBMC	*peripheral blood monoculear cells*, mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldeyd
pH_{Lys}	lysosomaler pH
PM	Plasmamembran
POS	*photoreceptor outer segments*, Photorezeptor-Außensegmente
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	*retinal pigment epithelium*, retinales Pigmentepithel
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	*shrimp alkaline phosphatase*
SDS	*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	*single nucleotide polymorphism*, Einzelnukleotid-Polymorphismus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	*T cell receptor*, T-Zell-Rezeptor
TEER	*transepithelial/transendothelial electrical resistance*, transepithelische/transendothelische elektrische Widerstand
TEMED	Tetramethylethylendiamine
TG	Thapsigargin
TMD	Transmembrandomänen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	*unfolded protein response,* ungefaltete Proteinantwort
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XBP1	*X-box binding protein 1*
YFP	*yellow fluoreszent protein*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des BEST1-Anionenkanals. 7

Abbildung 2: Farb-Fundusaufnahmen von M. Best, ADVIRC und ARB Patienten. 11

Abbildung 3: Kristallstruktur von normalem cBest1 mit markierten krankheitsverursachenden *BEST1* Mutationen. 41

Abbildung 4: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation von BEST1 in Kontroll-, M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. 44

Abbildung 5: Relative mRNA Expression von (A) *BEST1* und (B) *RPE65* in Kontroll-hiRPE-Zellen. 45

Abbildung 6: Relative mRNA Expression von (A) *BEST1* und (B) *RPE65* in M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. 45

Abbildung 7: Konsequenz des vorzeitigen Stopcodons infolge der *BEST1* Mutation p.(L197PX26). 46

Abbildung 8: BEST1 Proteinexpression in Kontroll-, M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. 47

Abbildung 9: Einfluss der ADVIRC-assoziierten *BEST1* Mutation p.(V86M) in Exon 4 auf das BEST1 mRNA Spleißen. 48

Abbildung 10: Repräsentative Kurven der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit Kontroll-, M. Best, ARB und ADVIRC hiRPE-Zellen. 51

Abbildung 11: Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit Kontroll-, M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. 52

Abbildung 12: Degradationsweg von fehlerhaftem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB hiRPE-Zellen. 55

Abbildung 13: Einfluss von M. $Best_{IN}$- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf den pH_{Lys}-Wert in hiRPE-Zellen. 57

Abbildung 14: Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die Reifung des lysosomalen Enzyms CTSD in hiRPE-Zellen. 58

Abbildung 15: Alignment der Sanger-Sequenzierungen nach PCR-Amplifikation der *BEST1* cDNA der neu generierten M. Best und ADVIRC MDCKII-Zelllinien. 60

Abbildung 16: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation von BEST1 in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. 61

Abbildung 17: Qualitative RNA- und Proteinexpression in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. 61

Abbildung 18: Repräsentative Kurven und Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. 63

Abbildung 19: Repräsentative Kurven der YFP-Fluoreszenzintensitäten in der Wiederholung des Halogenidtransport-Assays mit ADVIRC MDCKII-Zellen. 65

Abbildung 20: Stabilität von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. 66

Abbildung 21: Degradationsweg von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. 68

Abbildung 22: Quantifizierung der BEST1 Proteinexpression zur Bestimmung des Degradationswegs von mutiertem BEST1 Protein in M. Best, ADVIRC und ARB MDCKII-Zellen. 69

Abbildung 23: Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf das Spleißen von *XBP1* als Indikator für ER-Stress in MDCKII-Zellen. 70

Abbildung 24: Einfluss von M. Best-, ADVIRC- und ARB-assoziierten *BEST1* Mutationen auf die Reifung des lysosomalen Enzyms CTSD in MDCKII-Zellen. 71

Abbildung 25: Repräsentative Kurven und Quantifizierung der Steigung der YFP-Fluoreszenzintensitäten im Halogenidtransport-Assay mit MDCKII-Zellen, die normales nicht-markiertes BEST1 (WT) oder normales markiertes BEST1 (WT-1D4) exprimieren bzw. untransfiziert (MDCKII) sind. 73

Abbildung 26: Sanger-Sequenzierungen nach PCR-Amplifikation der *BEST1* cDNA der MDCKII-Koexpressions-Zelllinien. 74

Abbildung 27: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation von BEST1 in M. Best und ADVIRC MDCKII-Koexpressions-Zelllinien. 74

Abbildung 28: Stabilität von mutantem und wildtypischem BEST1 Protein in M. Best und ADVIRC MDCKII-Koexpressions-Zelllinien. 76

Abbildung 29: Graphische Darstellung der BEST1 Mutationsklassen illustriert an einer Zelle des RPEs. 87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und deren Hersteller 14
Tabelle 2: Verwendete Kit- und Reaktionssysteme und deren Hersteller....15
Tabelle 3: Verwendete Enzyme und deren Hersteller....16
Tabelle 4: Verwendete Vektoren und deren Herkunft 16
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper....17
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper....17
Tabelle 7: Verwendete Molekularmassenstandards und deren Hersteller....18
Tabelle 8: Name, Sequenz und Verwendungszweck der Oligonukleotide für die PCR und Sanger-Seqenzierung....18
Tabelle 9: Name, Sequenz und Sonde der Oligonukleotide für die qRT-PCR....19
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Patienten-abgeleiteten hiRPE-Zelllinien....20
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten hiPSC-Klone für die einzelnen Versuche 21
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten MDCKII-Zelllinien, die stabil verschiedene BEST1 Varianten exprimieren 22
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten MDCKII-Zelllinien, die stabil verschiedene BEST1 Varianten und YFP koexprimieren....22
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten MDCKII-Zelllinien, die stabil mutiertes und markiertes wildtypisches BEST1 koexprimieren 22
Tabelle 15: Weitere verwendete eukaryotische Zelllinien 23
Tabelle 16: Verwendete Medien und Zusätze für die Zellkultur und deren Hersteller....23
Tabelle 17: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen 24
Tabelle 18: Verwendete Geräte und deren Hersteller....25
Tabelle 19: Verwendete Software und deren Hersteller....27
Tabelle 20: Transfektionsansatz für die Kalziumphosphat-Methode....29
Tabelle 21: Transfektionsansatz mit Lipofectamine® 3000....30
Tabelle 22: Verwendete Konzentrationen zur Behandlung von hiRPE- und MDCKII-Zellen für Zellkulturversuche 32
Tabelle 23: Zusammensetzung der Lösungen für die Immunzytochemie....32
Tabelle 24: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese....33
Tabelle 25: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese 33
Tabelle 26: Reaktionsansatz für die RT-PCR mit der GoTaq® DNA-Polymerase....34
Tabelle 27: Thermocycler-Programm für die RT-PCR mit der GoTaq® DNA-Polymerase....34
Tabelle 28: Reaktionsansatz für die qRT-PCR 34
Tabelle 29: Thermocycler-Programm für die qRT-PCR 34
Tabelle 30: Reaktionsansatz für die enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten mit Exo und SAP....35
Tabelle 31: Thermocycler-Programm für die enzymatische Aufreinigung von PCR-Produkten mit Exo und SAP 35

Tabelle 32: Reaktionsansatz für die Sanger-Sequenzierung 36
Tabelle 33: Thermocycler-Programm für die Sanger-Sequenzierung 36
Tabelle 34: Zusammensetzung des Acrylamid-Sammelgels.....37
Tabelle 35: Zusammensetzung des Acrylamid-Trenngels 37
Tabelle 36: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für die Western Blot Analyse.....38
Tabelle 37: Zusammensetzung der Lösungen für den Halogenidtransport-Assay 38
Tabelle 38: TEER von hiRPE-Zellen nach einer Kultivierung von fünf Wochen auf Transwell-Filtern.....43
Tabelle 39: Charakteristika der BEST1 Mutationsklassen 88

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Bernhard Weber, der es mir ermöglichte am Institut für Humangenetik meine Dissertation anzufertigen und mir erlaubte, zahlreiche Erfahrungen durch die Teilnahme an Seminaren, Forschungs-Retreats und Tagungen zu sammeln.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Ernst Tamm und Prof. Dr. Beate Winner als meine Mentoren für wertvolle Diskussionen, Anregungen und Feedback.

Ganz besonders danke ich Andrea Milenkovic, für die Betreuung und Anleitung meiner Arbeit und ihre ständige Bereitschaft theoretisches und praktisches Wissen mit mir zu teilen.

Dem kompletten Team des Instituts danke ich von Herzen für den einzigartigen Zusammenhalt, den Erfahrungsaustausch und dem Spaß im Labor. Ihr habt maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die Unterstützung und die nötige Ablenkung in den letzten Jahren.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Anna-Lena Nachtigal, geboren am 16.03.1991 in Ingolstadt, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 12.02.2021 Anna-Lena Nachtigal