Aus dem Lehrstuhl
für Humangenetik
Prof. Dr. Bernhard Weber
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Optimierung der Chlorid-Kanalfunktion von mutantem Bestrophin-1

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Huttner

2024

Aus dem Lehrstuhl
für Humangenetik
Prof. Dr. Bernhard Weber
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Optimierung der Chlorid-Kanalfunktion von mutantem Bestrophin-1

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Huttner

2024

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Wetzel
Tag der mündlichen Prüfung:	03.05.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **6**
Summary **8**
1. Einleitung **10**
1.1 Das Auge 10
1.2 Die Netzhaut - Aufbau und Funktion 10
1.3 Das retinale Pigmentepithel - eine besondere Schicht der Netzhaut 11
1.4 Chloridionenkanäle 12
1.4.1 Die LRRC8-Proteinfamilie als volumenregulierte Cl^--Kanäle 13
1.4.2 Die TMEM16-Proteinfamilie als Ca^{2+}-aktivierte Cl^--Kanäle 14
1.4.3 Bestrophine 16
1.5 Bestrophinopathien 21
1.5.1 BVMD 22
1.5.2 ADVIRC 23
1.5.3 ARB 24
1.6 Therapie von Bestrophinopathien 24
1.6.1 Gentherapie 25
1.6.2 Medikamentöse Therapieansätze 26
1.7 Ziel der Arbeit 27
2 Material und Methoden **28**
2.1 Chemikalien und Reagenzien 28
2.2 Zellkultur 28
2.2.1 Geräte und Materialien: 28
2.2.2 Substanzen und Kulturmedien 29
2.2.3 Kultivierung verschiedener Zelllinien 31
2.2.4 Beschichtung von Deckgläschen 34
2.2.5 Transiente Transfektion verschiedener Zelllinen 35
2.2.6 Vorbereitung von Zellen für elektrophysiologische Untersuchungen mittels Patch Clamp 39
2.3 Immunozytochemie an hiPSC-RPE Zellen 41
2.4 Patch-Clamp 43
2.4.1 Aufbau des Patch-Clamp Setups 43
2.4.2 Erreichen der Whole-cell Konfiguration 45
2.4.3 Lösungen 46

2.4.4 Whole-cell Messungen an verschiedenen Zelllinien 46
2.5 Datenanalyse, graphische Darstellung und Statistik 47
3. Ergebnisse 49
3.1 Qualitative Beurteilung von hiPSC-RPE Zelllinien 49
3.2 Charakterisierung der hiPSC-RPE Zellen mittels immunzytochemischer Färbung 49
3.3 Funktionelle Charakterisierung der BEST1-Kanalfunktion mittels Whole-cell Messungen an hiPSC-RPE Zellen 50
3.3.1 Typisierung der hiPSC-RPE Zellen anhand ihrer spezifischen Kapazität 51
3.3.2 Stromprofil von hiPSC-RPE bei 37°C mit 0,38 µM Ca^{2+} 52
3.3.3 Stromprofil von hiPSC-RPE bei unterschiedlichen Ca^{2+}-Konzentrationen 56
3.3.4 Stromprofil von hiPSC-RPE bei 24°C und 0,38 µM Ca^{2+} 58
3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen im Überexpressionssystem 60
3.4.1 Kapazität von HEK293T und Y79 Zellen 60
3.4.2 Elektrophysiologie an HEK293T und Y79 Zellen 61
3.4.3 Aktivierung im Zeitverlauf in verschieden Zelllinien 63
3.4.4 Transfektion von HEK293T und Y79 Zellen 64
3.4.5 Elektrophysiologie an transfizierten HEK293T Zellen 66
3.5 Strom-/Spannungsdiagramme 68
4. Diskussion 70
4.1 Untersuchungen an hiPSC-RPE Zellen 71
4.1.1 Charakterisierung der Zellgröße mithilfe der Kapazität (c-slow Wert) der einzelnen hiPSC-RPE Linien 71
4.1.2 Whole-cell Messungen an hiPSC-RPE Zellen 72
4.2 Untersuchungen an HEK293T und Y79 Zellen 75
4.2.1 Whole-cell Messungen an nicht-transfizierten Zellen 75
4.2.2 Generation von Überexpressionssystemen 76
4.2.3 Whole-cell Messungen in transfizierten HEK293T Zellen 77
4.3 Strom-/Spannungsdiagramme 80
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick 81
Abkürzungsverzeichnis 84
Abbildungsverzeichnis 88
Tabellenverzeichnis 89
Literaturverzeichnis 90
Eidesstattliche Erklärung 103

Danksagung 104

Zusammenfassung

Das retinale Pigmentepithel (RPE) stellt eine wichtige einschichtige Zellschicht zwischen der äußeren Netzhaut (Retina) und der Aderhaut (Choroidea) im menschlichen Auge dar. Transportprozesse und Stoffwechselvorgänge dieser Zellen tragen dazu bei, die Funktionalität der Sinnesrezeptoren der Netzhaut aufrechtzuerhalten. Ein wichtiger Akteur in diesen Transportvorgängen ist das im RPE basolateral lokalisierte Kanalprotein BEST1. Dieses setzt sich aus fünf gleichen BEST1 Untereinheiten zusammen und bildet einen Ionenkanal, der Chloridionen aus den RPE Zellen abtransportiert. Mutationen im zugrunde liegenden *hBEST1*-Gen sind ursächlich für Funktionseinschränkungen als Folge einer fehlerhaften Cl^--Leitfähigkeit, die je nach Art und Lokalisation der Mutation zu unterschiedlichen monogenen Netzhauterkrankungen führen können. Dazu zählen die autosomal-dominante Best´sche vitelliforme Makuladegeneration (Morbus Best), die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) und die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (ARB). Bislang besteht für keine dieser Erkrankungen eine effektive Therapie. Studien der letzten Jahre zeigen bereits erste vielversprechende positive Effekte für einige Wirkstoffe. Auch am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg wurde eine dieser Wirkstoffgruppen entdeckt, deren Effektivität zur Verbesserung der BEST1-Funktionalität mit Hilfe der Patch-Clamp Technik in dieser Arbeit direkt bestätigt werden sollte. Dafür standen aus Vorarbeiten vier Zelllinien aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen zur Verfügung, die zu RPE-Zellen ausdifferenziert worden waren. Die beiden Linien hiPSC-RPE BEST +/+ und die hiPSC-RPE LRRC8A -/- stellten dabei Positivkontrollen mit endogen exprimierten nativen BEST1 Untereinheiten dar, während hiPSC-RPE BEST -/- eine Negativkontrolle darstellte, die kein BEST1 synthetisieren konnte. In der Patienten-abgeleiteten Linie hiPSC-RPE BEST +/R218C sollte dann die gefundene Wirkstoffgruppe überprüft werden. Zudem wurden auch Messungen an zwei weiteren Zelllinien (HEK293T und Y79) vorgenommen, um die Kapazität, den Anstieg der Stromantwort im Zeitverlauf und die Stromdichte bei Verwendung einer 0,38 µM Ca^{2+} enthaltenden Intrazellulärlösung zur Induktion einer Cl^--Leitfähigkeit charakterisieren und einordnen zu können. Signifikante Unterschiede zwischen den hiPSC-RPE Linien zeigten sich hierbei in der durchschnittlichen Größe der Zellen, welche über die Kapazität bestimmt werden konnte. Die beiden Knock-out Linien fielen durch ein im Vergleich zur Kontrolllinie

BEST +/+ oder der Patienten-abgeleiteten Linie BEST +/R218C grundsätzlich erhöhtes Zellvolumen auf. In drei verschiedenen Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Temperaturen und Ca^{2+}-Konzentrationen konnten allgemeine Aktivierungseffekte, jedoch keine BEST1-assoziierten Unterschiede des Stromanstiegs oder der Stromdichte festgestellt werden. Bereits an diesem Punkt konnte somit keine Unterscheidung der unterschiedlichen hiPSC-RPE Linien festgestellt werden. Die Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration führte zudem zu Messfehlern, die einen starken Einfluss auf die Verwertbarkeit der hier beobachteten Stromkurven hatten. Dadurch konnten Effekte von Wirkstoffderivaten auf die mutierten Kanaluntereinheiten nicht überprüft werden. Die Stromentwicklung in den hiPSC-RPE Linien unterschied sich dabei aber deutlich von den Aktivierungsverläufen, die in HEK293T und Y79 Zellen festgestellt werden konnten, und in diesen anderen Zellsystemen merklich geringer ausfielen. Eine intensive Fehlersuche zeigte, dass vermutlich eine unzureichende Aktivierung von BEST1 dem Messproblem zugrunde lag. Alternativ könnte ein Überlagern der Effekte durch unabhängige endogen exprimierte Kanäle in den hiPSC-RPE Zellen aufgetreten sein. In weiterführenden Untersuchungen sollte zunächst im Überexpressionssystem ein stabiles BEST1-Signal mithilfe des Patch Clamp Messverfahrens abgeleitet werden können, bevor die Fortsetzung von weiteren Messreihen mit den verfügbaren Wirkstoffderivaten sinnvoll erscheint.

Summary

The retinal pigment epithelium (RPE) is an important monolayer in the human eye, located between the outer retina and the choroid. Essential transport and metabolism processes of these cells maintain the functionality of the photoreceptors in the retina. One fundamental player in all those actions is the in RPE cells basolateral localized channel protein BEST1. This, five homologous subunits containing, ion channel eliminates Cl^- ions from the cytoplasma. Mutations in corresponding *hBEST1* gene lead to a diminished functionality of this process. Depending on the localisation of the mutation site there are different effects on the ion channel. Therefore a few different monogenetic diseases are known to be caused by mutated BEST1. The autosomal-dominant Best´s vitelliform macular degeneration (Best´s disease), autosomal-dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC) and autosomal-recessive bestrophinopathy (ARB) belong to that class. Until now no effective treatment option is known for any of those diseases. Former studies revealed a number of promising derivates, that could lead to an improvement of channel function. Also, at the institute of human genetics of the university of Regensburg an optional treatment substance has been identified and should now be tested directly in this work using patch-clamp electrophysiology to examine the effectiveness of different derivates. Four human induced pluripotent stem cell derived RPE cell lines have been established previously and were available for the experiments. Two of those cell lines were used as a positive control with endogenous expressed BEST1 subunits (hiPSC-RPE BEST +/+ and hiPSC-RPE LRRC8A -/-) whilst one served as a negative control without the possibility to produce BEST1 protein (hiPSC-RPE BEST -/-). The patient-derived line hiPSC-RPE BEST +/R218C was meant to be used for testing the promising treatment derivates. Furthermore, patch experiments were performed in HEK293T and Y79 cells to evaluate the reactions that occurred in the hiPSC-RPEs containing the characterisation by their capacitance, increase of current over time and their current density activated due to the presence of 0,38 µM of Ca^{2+} in the intracellular solution. Significant differences between the hiPSC-RPE lines could be seen in the average size of the cells, determined by their capacitance. Both knock-out lines showed an increased cell volume in comparison to the control line BEST +/+ or the patient-derived line BEST +/R218C. But when three variable settings with different temperature and Ca^{2+} concentrations were sat up to measure Cl^- conductance, no differences between the hiPSC-RPE lines could be seen. Each revealed an activation per cell line but without

any variance it must be concluded that no BEST1-associated effects have been recorded. So, even a differentiation at control level failed. Additionally, increase in Ca^{2+} concentration led to measurement errors, that displayed strong influence in interpreting the measured current traces. Therefore, effects of the tested derivates on mutated channel subunits in general couldn´t be proved. However, hiPSC-RPE cells always reached significant higher activation levels than HEK293T or Y79 cells did. After intensive exclusion of error sources, it seemed most likely that an insufficient activation of BEST1 was the reason for the measurement errors. An alternative occasion for those problems could have been the covering of BEST1 effects by other endogenous expressed channels in hiPSC-RPE cells. Further experiments now should at first try to generate a pure BEST1 patch clamp signal in overexpression systems until measurements with derivates could be continued.

1. Einleitung

1.1 Das Auge

Für die Aufnahme visueller Reize ist ein komplexer Lichtbrechungs- und Verarbeitungsprozess von einfallendem Licht auf die Netzhaut notwendig. Der Aufbau des Auges ist evolutionär genau auf diese Prozesse spezialisiert (Lamb et al. 2007). Einfallendes Licht wird im vorderen Augenpol durch die Cornea gebrochen und anschließend durch erneute Brechung in der Linse feinjustiert, sodass die Lichtstrahlen genau an der im hinteren Augenpol befindlichen Netzhaut (Retina) im Zentrum des Gelben Flecks (Macula lutea) in einem Punkt auftreffen. Dieser Ort des schärfsten Sehens wird Fovea centralis genannt und stellt eine Stelle mit hoher Fotorezeptordichte der Zapfen dar (Schünke et al. 2015). Aufgrund der starken Beanspruchung der lichtaktiven Sinneszellen und der hohen Zelldichte ist dies auch ein sehr stoffwechselaktiver Bereich (Welsch et al. 2014). Allgemein setzt sich der Aufbau des Augapfels aus drei Schichten zusammen: der den gesamten Augapfel umgebenden Sclera als äußere Begrenzung, der darunterliegenden Choroidea, die mithilfe ihrer sich darin befindlichen Blutgefäße für die Versorgung des Auges verantwortlich ist, und der ganz innen liegenden Netzhaut, welche durch ihren komplexen Aufbau aus neuronalen und glialen Zellen für die Weiterleitung der Lichtreize verantwortlich ist (Schünke et al. 2015; Welsch et al. 2014).

1.2 Die Netzhaut - Aufbau und Funktion

An der Funktionalität der Netzhaut ist eine Vielzahl an Zellen beteiligt, einige wichtige davon sind in **Abbildung 1** dargestellt. Grundsätzlich lässt sich der Aufbau der Netzhaut aus zwei Keimblättern herleiten: das Stratum nervosum und das Stratum pigmenti. Die äußerste Schicht stellt das Stratum pigmenti dar, welches sich in das retinale Pigmentepithel (RPE) entwickelt und vor allem für die Aufrechterhaltung des Mikromilieus zuständig ist. An seiner basalen Seite folgt im Nachgang die Bruch Membran, ein ca. 2 µm breite Schicht, die die Basallamina der Pigmentepithelzellen sowie elastische Fasern beinhaltet. Unterhalb dieser Membran befinden sich bereits die fenestrierten Kapillaren der Choroidea, worüber die äußeren Anteile der Netzhaut mit Nährstoffen versorgt und Abfallprodukte des Sehprozesses abtransportiert werden

können. Der apikalen Seite des RPE schließt sich die erste Schicht des Stratum nervosum an. Diese wird durch eine enge Aneinanderreihung von Stäbchen- und Zapfenzellen gebildet. Die beiden Zelltypen zählen als Neurone und sind für die Aufnahme der Lichtreize verantwortlich. Dabei werden kontinuierlich äußere Anteile ihrer Fortsätze abgestoßen und regeneriert. Abgespaltene Fotorezeptoraußensegmente werden vom retinalen Pigmentepithel aufgenommen und abgebaut. Die neuronalen Reize, die in den Stäbchen und Zapfen durch die Absorption von Licht entstehen, werden dann in die dem Augeninneren zugewandten Schichten der Netzhaut weitergeleitet. In acht weiteren Schichten des Stratum nervosums finden sich die Bipolar- und Ganglienzellen, welche die Informationen bündeln und über die efferenten Axone der Ganglienzellen den Nervus opticus bilden. Als solcher laufen die Fasern aus dem Auge heraus und leiten die Signale an das visuelle System des Cortex cerebri weiter. Gliazellen sowie weitere unterstützende Zellen im Bereich der Netzhaut komplettieren das Stratum nervosum (Welsch et al. 2014; Schünke et al. 2015).

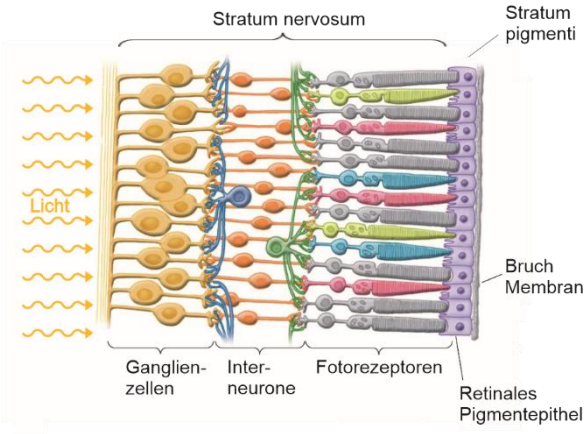


Abbildung 1: Aufbau der Netzhaut

Die äußere Schicht der Netzhaut wird durch das Stratum pigmenti, bestehend aus retinalem Pigmentepithel und der Bruch Membran gebildet. Nach innen schließen sich die Fotorezeptoren an, welche über Bipolarzellen mit retinalen Ganglienzellen verknüpft sind, so das Stratum nervosum bilden und auf diesem Weg Lichtreize in das neuronale System weiterleiten. (Abbildung modifiziert nach Hartzell et al. 2005)

1.3 Das retinale Pigmentepithel - eine besondere Schicht der Netzhaut

Das retinale Pigmentepithel stellt eine wichtige Zwischenschicht mit vielfältigen Aufgaben dar. Das einschichtige, kubische Epithel ist in einen apikalen und basolateralen Bereich aufgeteilt, welcher unter anderem durch Zonulae occludentes unterteilt wird. Zudem zeigt sich im Querschnitt der Zellen eine sehr regelmäßige hexagonale Form. Der apikale Zellpol umschließt mit seinen langen Ausstülpungen (Mikrovilli) die Außensegmente der Fotorezeptoren (Welsch et al. 2014). So können zwei zentrale Aufgaben einfach übernommen werden. Erstens ist die Phagozytose von

abgestoßenen Fotorezeptoraußensegmenten zu nennen, welche aufgrund der ständigen Erneuerung der Membranen von Stäbchen und Zapfen dauerhaft anfallen, und zweitens die Konstanthaltung der Ionenverteilung des Extrazellulärraums, welcher die Fotorezeptoren umgibt (Strauss 2005). Eine große Anzahl an Ionenkanälen ist daher sowohl in der apikalen als auch basolateralen Membran des RPE lokalisiert (Reichhart und Strauss 2014). Über diese Ionenkanäle und Transporter wird ein Ionenfluss über die Plasmamembran generiert, der sowohl für den Abtransport von Abfallprodukten des Stoffwechsels der Fotorezeptoren, als auch für zelleigene Regulationsprozesse wie die Aufrechterhaltung des Zellvolumens und des pH-Werts verwendet wird (Planells-Cases und Jentsch 2009). Zudem wird durch die Polarität und die Aufrechterhaltung des Membranpotentials eine Triebkraft für den Ionentransport durch das Epithel hindurch generiert. Ionen können somit über die apikale Seite aufgenommen und die basolaterale Seite wieder abgegeben werden. Als Motor für die meisten dieser Transportvorgänge fungiert die apikal gelegene Na^+/K^+-ATPase (Reichhart und Strauss 2014). Der polare Aufbau des RPE sowie das Vorhandensein der Kanäle sorgt so für eine weitere wichtige funktionelle Komponente dieser Zellschicht: die Blut-Netzhaut-Barriere. Diese verhindert den Übertritt unerwünschter Substanzen aus dem Blut in das Auge und auch den Verlust wichtiger Komponenten des Sehprozesses, wie z.B. des Sehpigments Rhodopsin, in den Gesamtkreislauf (Welsch et al. 2014).

Ein im Rahmen dieser Arbeit wichtiger Transportprozess ist die Eliminierung von Cl^--Ionen aus dem Extrazellulärraum und deren Abtransport über den Blutweg (Hartzell et al. 2005). Apikal wird dieser Transportprozess vor allem durch den $Na^+/K^+/2Cl^-$-Co-Transporter getragen (Planells-Cases und Jentsch 2009). Der hohe basolaterale Ausstrom von Cl^- erfolgt wiederum zum Großteil über Ca^{2+}-aktivierte Cl^--Kanäle. Eine wichtige Rolle dabei scheint der Bestrophin-1 Kanal zu spielen (Reichhart und Strauss 2014).

1.4 Chloridionenkanäle

Chloridionenkanäle sind im Organismus ubiquitär in Transportprozesse und Signaltransduktion involviert (Duran et al. 2010). Obwohl ihre Permeabilität meist nicht nur auf Cl^- beschränkt ist, sondern auch weitere große und kleine Anionen, wie z.B.

HCO_3^-, I^-, Br^-, F^- miteinschließt (Yang et al. 2008; Nilius et al. 1997; Kane Dickson et al. 2014), stellen sie einen elementaren Bestandteil vieler Stoffwechselvorgänge dar. Daher sind auch eine Vielzahl von verschiedenen Genen und Proteinfamilien in die Liste der Chloridkanäle aufzunehmen. Ebenso resultiert ein breites Spektrum an verschiedenen Krankheiten aus einer Fehlfunktionalität einzelner Chloridkanäle (Duran et al. 2010). Einem autosomal rezessiven Erbgang folgend kann so z.B. bei der zystischen Fibrose ein Funktionsausfall des *CFTR*-Gens beobachtet werden, was in einer verminderten Cl^--Leitfähigkeit des respiratorischen Ziliarepithels resultiert (Radlovic 2012). Aber auch weitere sehr unterschiedliche Erkrankungen, wie z.B. Epilepsie, lysosomale Speichererkrankungen, renaler Salzverlust oder Taubheit können auf eine Beeinträchtigung eines Cl^--Transports zurückzuführen sein (Duran et al. 2010; Planells-Cases und Jentsch 2009). Im retinalen Pigmentepithel wird eine Vielzahl an unterschiedlichen Chloridkanälen exprimiert (Milenkovic et al. 2015), von denen die volumenregulierten und Ca^{2+}-aktivierten Cl^--Kanäle im Folgenden näher erläutert werden sollen.

1.4.1 Die LRRC8-Proteinfamilie als volumenregulierte Cl^--Kanäle

Leucin-rich-region-containing-Proteine 8 (LRRC8) stellen eine ubiquitär vorkommende Gruppe mit fünf Familienmitgliedern dar. Sechs Untereinheiten der LRRC8-Familie schließen sich zu heteromeren Kanälen zusammen (Abascal und Zardoya 2012; Deneka et al. 2018). Die Familie beinhaltet die Mitglieder LRRC8A-E, wobei das LRRC8A Protein die essentielle Untereinheit darstellt, welche für die grundsätzliche Funktionalität eines Kanals vorhanden sein muss. Mithilfe der weiteren Untereinheiten werden die physiologischen Eigenschaften der Ionenkanäle modifiziert (Voss et al. 2014; König und Stauber 2019). Grundsätzlich können so volumenregulierte Anionenkanäle (volume regulated anion channels/*VRACs*) gebildet werden, die durch hypotone Umgebung aktiviert werden und damit eine große Rolle in der Regulation des Zellvolumens spielen (Voss et al. 2014; Qiu et al. 2014). Eine LRRC8-Einheit besteht aus ca. 800 Aminosäuren, die in der ersten Hälfte des Proteins vier Transmembrandomänen ausbilden. Der zweite Anteil liegt intrazellulär und ist für die spezifischen Eigenschaften gebildeter Kanäle verantwortlich. So wird beispielsweise die Permeabilität für verschiedene Anionen reguliert (Abascal und Zardoya 2012; Deneka et al. 2018; Kefauver et al. 2018). Nach aktuellem Kenntnisstand reagieren

LRRC8-Kanäle auf Zellschwellung (Jentsch 2016; Pedersen et al. 2016), wobei die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels dabei ebenfalls eine Rolle zu spielen scheint (Centeio et al. 2020). Zudem kommen sie nicht nur an der Plasmamembran von Zellen vor, sondern auch beispielsweise in der Membran von Lysosomen, wo sie ebenfalls eine zentrale Rolle in der Osmoregulation einnehmen (Li et al. 2020). Auch in RPE-Zellen wurde bereits die Expression von LRRC8 nachgewiesen (Milenkovic et al. 2015).

1.4.2 Die TMEM16-Proteinfamilie als Ca^{2+}-aktivierte Cl^--Kanäle

Die auch als Anoctamine bezeichneten Proteine der TMEM16-Familie umfassen 10 Mitglieder mit zum Teil sehr unterschiedlichen Eigenschaften (Oh und Jung 2016). Bereits die Sequenzübereinstimmung zwischen den einzelnen Mitgliedern ist zum Teil sehr gering und beschränkt sich vor allem auf hochkonservierte Regionen (Pedemonte und Galietta 2014; Milenkovic et al. 2010; Galietta 2009). Viele Funktionen dieser Familie sind noch nicht vollends verstanden oder werden weiterhin intensiv diskutiert (Falzone et al. 2018). Zwei bislang entdeckte Haupteigenschaften scheinen eine auswärts gerichtete Cl^--Leitfähigkeit sowie eine Scramblase-Aktivität zu sein, welche eine Umverteilung von Phospholipiden in der Plasmamebran bewirkt. (Galietta 2009; Pedemonte und Galietta 2014; Picollo et al. 2015). Vereinzelt werden allerdings auch andere Eigenschaften, wie beispielsweise eine Kationenleitfähigkeit beschrieben (Yang et al. 2012). Dies führt zu zum Teil großen Uneinigkeiten über die tatsächlich auf Zellebene stattfindenden Effekte. Gemeinsam ist den TMEM16-Proteinen, dass sie 10 Transmembrandomänen besitzen, als Dimere vorkommen und auf eine Aktivierung mit Ca^{2+} reagieren (Fallah et al. 2011; Brunner et al. 2016). N- und C-Terminus liegen jeweils im Cytosol (Picollo et al. 2015). Zwei Mitglieder dieser Gruppe haben eine direkte Relevanz für diese Arbeit und sollen im Folgenden genauer vorgestellt werden.

1.4.2.1 TMEM16A

Das TMEM16A oder auch Anoctamin-1 genannte Protein ist ein, zumindest im HEK-Zell-Überexpressionssystem, bereits bei niedrigen physiologischen Ca^{2+}-Konzentrationen aktiver Cl^--Kanal an der Plasmamembran (Hartzell et al. 2009; Rock

et al. 2009). Die Sensitivität gegenüber Calcium scheint dabei spannungsabhängig zu sein und eine gewisse volumenabhängige Komponente beeinflusst die Cl^--Leitfähigkeit ebenfalls (Yang et al. 2008; Almaça et al. 2009). Zudem weisen Daten von Elverson et al. aus 2023 darauf hin, dass die Cl^--Leitfähigkeit pH-abhängig inaktiviert werden kann. Eine Scramblase-Funktion konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Suzuki et al. 2013; Yu et al. 2015; Gyobu et al. 2016). In seiner Funktion als Chloridkanal wird TMEM16A weitläufig exprimiert. So ist das Protein z.B. in vielerlei sekretorischen Epithelien vertreten und sorgt dort für die Ausschleusung von Cl^--Ionen. Speicheldrüsen, Schweißdrüsen, Epithelzellen der Atemwege oder des intestinalen Systems erhalten so ihre Funktionalität (Pedemonte und Galietta 2014). Des Weiteren scheint TMEM16A auch eine Kontrollfunktion des vaskulären Tonus innezuhaben, da es in glatten Muskelzellen sehr präsent ist und durch dessen Blockierung eine Vasorelaxation verursacht werden kann (Manoury et al. 2010). Ebenfalls beteiligt ist das Kanalprotein an variablen Prozessen der Schmerzverarbeitung und -weiterleitung, wodurch Effekte auf thermische Reize, nozizeptive und neuropathische Schmerzen entstehen (Cho et al. 2012; Lee et al. 2014). Zusätzlich scheint es eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Migration innezuhaben und diese zu induzieren. Eine vermehrte Expression in einigen Tumoren ist daher zu beobachten (Oh und Jung 2016). Strukturell ist TMEM16A als Homodimer zu finden (Fallah et al. 2011; Tien et al. 2013), wobei auch die Formation von Heterodimeren mit anderen TMEM16-Untereinheiten nicht ausgeschlossen werden kann (Picollo et al. 2015).

1.4.2.2 TMEM16F

Auch TMEM16F (oder Anoctamin-6) weist eine Ca^{2+}-Aktivierung auf. Wie von einigen Arbeitsgruppen bestätigt, wird dadurch eine Scramblasefunktion initiiert (Yu et al. 2015; Le et al. 2019; Suzuki et al. 2010). Konkret wird mithilfe der Scrambling-Domäne in TMEM16F vor allem Phosphatidylserin von der dem Zellinneren zugewandten Seite der zweischichtigen Membran an die Außenseite transportiert (Bevers und Williamson 2010; Gyobu et al. 2017). Dieser Prozess spielt in vielen Zellen eine gewisse Rolle, ist aber vor allem in Thrombozyten sehr relevant, da hierdurch der Koagulationsprozess initiiert werden kann (Fujii et al. 2015; Kodigepalli et al. 2015). Mutationen im *TMEM16F*-Gen führen somit auch zu einer sehr seltenen Blutgerinnungsstörung, dem Scott-Syndrom (Zwaal et al. 2004; Suzuki et al. 2010). Des Weiteren wird TMEM16F

aber auch in einer Vielzahl weiterer Zellen exprimiert und trägt hier durch die Phospholipidumverteilung am ehesten zu apoptotischen Prozessen bei (Suzuki et al. 2013; Pedemonte und Galietta 2014). Auch im humanen retinalen Pigmentepithel ist TMEM16F sehr stark exprimiert (Milenkovic et al. 2015). Zusätzlich ist es möglich, dass TMEM16F-Kanäle noch eine weitere Funktion besitzen. Die Datenlage hierzu ist nicht eindeutig, doch in mehreren Studien wurde auch eine zusätzliche auswärts gerichtete Cl^--Leitfähigkeit festgestellt (Martins et al. 2011; Schreiber et al. 2018; Shimizu et al. 2013; Grubb et al. 2013). Uneinigkeit herrscht allerdings bereits hier bezüglich der Ca^{2+}-Sensitivität, welche die einzelnen Gruppen feststellen konnten. Zudem zeigten Yang et al. 2012 anstelle einer Anionenleitfähigkeit in Axolotl-Oozyten eine unspezifische Kationenleitfähigkeit und Suzuki et al. konnten eine Funktionalität als Ionenkanal generell nicht bestätigen. Neuere Studien zeigen eine Temperaturabhängigkeit der einzelnen Funktionen. Lin et al. beschreiben so eine Aktivierung als Cl^--Kanal bei physiologischen Temperaturen um 37 °C, während die Scramblaseaktivität eher bei geringeren Werten um 27 °C ausgeprägt ist. Auch Schreiber et al. konnten die Aktivität von TMEM16F als Chloridkanal bei 37 °C nachweisen.

1.4.3 Bestrophine

Die Bestrophine stellen eine sehr weit verbreitet Gruppe von Membranproteinen dar, die initial in Caenorhabditits elegans identifiziert wurde (Marmorstein und Kinnick 2007). Sowohl in Vertebraten, Amphibien, Nematoden und Insekten als auch in Pflanzen, Pilzen und Bakterien sind Mitglieder der Familie bekannt (Hartzell et al. 2008). Diese sind zwar zum Teil nur sehr entfernt miteinander verwandt, weisen aber an Schlüsselpositionen stark konservierte Aminosäuresequenzen auf. Die Anzahl an Bestrophin-Paralogen der einzelnen Spezies variiert hierbei von einem einzigen Genprodukt bei primitiven Chordaten bis hin zu 25 bei Caenorhabditis elegans. Säugetiere weisen üblicherweise vier paraloge Gene auf (Milenkovic et al. 2008). Beim Menschen sind die Subtypen *hBEST1-4* bekannt. Wichtigster Vertreter hierbei ist das Gen *hBEST1*, dessen Funktion seines Genprodukts zwar noch nicht vollständig entschlüssselt ist, welches aber in jedem Fall eine Rolle als Chloridkanal im retinalen Pigmentepithel einnimmt (Sun et al. 2002). Bei Bakterien hingegen fungieren Bestrophine trotz ähnlicher Grundstruktur auch als Kationenkanäle (Yang et al. 2014).

Die Gene *hBEST2-4* stellen ebenfalls Cl^--Ionenkanäle dar, deren Funktion im menschlichen Organismus allerdings weitgehend unverstanden ist (Milenkovic et al. 2009). Des Weiteren konnte bislang nur bei Mutationen von *hBEST1* eine klinisch relevante Erkrankung festgestellt werden.

1.4.3.1 Struktur von BEST1

Das Genprodukt von *hBEST1* Bestrophin-1 (BEST1) stellt ein integrales Membranprotein mit einer Länge von 585 Aminosäuren dar (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998). Dem relativ kurzen intrazellulär liegenden N-Terminus folgen vier Transmembrandomänen sowie ein langer erneut cytoplasmatisch gelegener C-Terminus (Milenkovic et al. 2007). Nach relativ widersprüchlichen Angaben im Vorfeld bezüglich einer Oligomerisierung konnten 2014 zwei verschiedene BEST1-Kanäle röntgenkristallografisch analysiert werden, der prokaryotische BEST1-Kanal aus Klebsiella pneumoniae von Yang et al. und das Hühnchen-BEST1 Homolog von Kane Dickson et al. (siehe **Abbildung 2**). Des Weiteren konnten Owji et al. im Jahr 2022 mittels Kryoelektronenmikroskopie die Strukturmodelle von humanem BEST1 und 2 identifizieren. Hieraus ergab sich klar die Struktur eines homopentameren Kanals aus jeweils identischen Untereinheiten, die sich durch Interaktionen zwischen der N- und C-terminalen Region miteinander verbinden (Qu et al. 2009). Dadurch entsteht zentral in diesem Oligomer eine ionenleitende Pore, welche zwei spezifische Verengungen aufweist. In etwa auf Höhe des inneren Durchtrittspunkts durch die Zellmembran bilden je drei Aminosäuren pro Untereinheit das sogenannte „Neck“. Dieser Bereich ist für die Permeabilität des Kanals zuständig und kann durch Konformationsänderung geöffnet oder geschlossen werden (Vaisey et al. 2016; Miller et al. 2018). Das „Neck“ besteht dabei aus einer Kombination an hoch-konservierten Aminosäuren, die in allen bisher untersuchten Strukturmodellen die Abfolge I76, F80 und F84 aufweisen (Owji et al. 2022). Eine weitere Engstelle ist am cytosolischen Ende der Pore zu finden. Sie wird „Apertur“ genannt und stellt einen Selektivitätsfilter dar. Im Hühnchen-BEST1 setzt sich diese ringförmige Konfiguration nur aus einer Aminosäure zusammen (V205) (Kane Dickson et al. 2014) Dieser Abschnitt wird bei Konformationsänderung nicht erweitert, stellt die engste Stelle im Ionenkanal dar und weist eine lyotrope Permeabilität auf (Vaisey et al. 2016; Miller et al. 2018; Owji et al. 2022). Die beste Leitfähigkeit zeigt sich dabei für SCN^-, gefolgt von I^-, Br^- und Cl^-. Sie folgt somit der Dehydrierbarkeit von Anionen, da für SCN^- am wenigsten und Cl^- am meisten Energie

aufgewendet werden muss. Im Gegensatz dazu konnte bei humanem BEST1 erneut eine Kombination aus drei Aminosäuren (I205, Q208 und N212) festgestellt werden, welche den Apertur-Bereich bilden. Dennoch stellt auch hier die Position 205 den engsten Bereich der Pore dar (Owji et al. 2022). Beide Regionen sind Hotspots für pathogene Mutationen. Während im Neck-Bereich dabei die Ionenleitfähigkeit beeinträchtigt wird, geht bei Mutation der Apertur die Ionenselektivität verloren (Vaisey et al. 2016; Ji et al. 2019a). Des Weiteren konnte ein dritter relevanter Bereich entschlüsselt werden, die sogenannten „Ca^{2+}-Clasps“. Auch hier existiert eine Clasp pro Untereinheit. Diese Region ist für die Bindung von Ca^{2+} verantwortlich und umschließt gürtelförmig in etwa die Mitte der Pore (Vaisey et al. 2016). Bei Bindung von Ca^{2+}-Ionen kommt es so zu einer Konformationsänderung, die sich auf die Neck-Region auswirkt und somit den Öffnungs- und Verschlussmechanismus der Pore beeinflusst (Vaisey et al. 2016; Miller et al. 2018). Der Einfluss von Ca^{2+} alleine ist allerdings nicht ausreichend, um den Kanal vollständig zu öffnen. Im intrazellulär gelegenen Loop 2 wurde ein ATP-Bindungsmotiv identifiziert. Die Bindung von ATP in diesem Bereich führt zu einer weiteren Konformationsänderung und damit vollständigen Öffnung des Kanals (Zhang et al. 2018). Dieser ist also nur in Anwesenheit von Ca^{2+} und ATP ausreichend aktiv. Eine weitere regulatorische Komponente wird dem C-Terminus zugesprochen, welcher bei hohen intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen den Kanal zu inaktivieren scheint (Vaisey und Long 2018). Dies wird auch durch neuere Erkenntnisse von Owji et al. unterstützt. Die Strukturanalyse zeigt eine Umschlingung der Neck-Region mit dem C-terminalen Ende des Proteins. Erst bei Lösung dieser Konfiguration wird der vollständige Öffnungszustand des Kanals erreicht. Zudem weisen Ergebnisse von Kim et al. darauf hin, dass das C-terminale Ende des Proteins Einfluss auf die Expressionsmenge sowie den Transport zur Zellmembran von BEST1 hat.

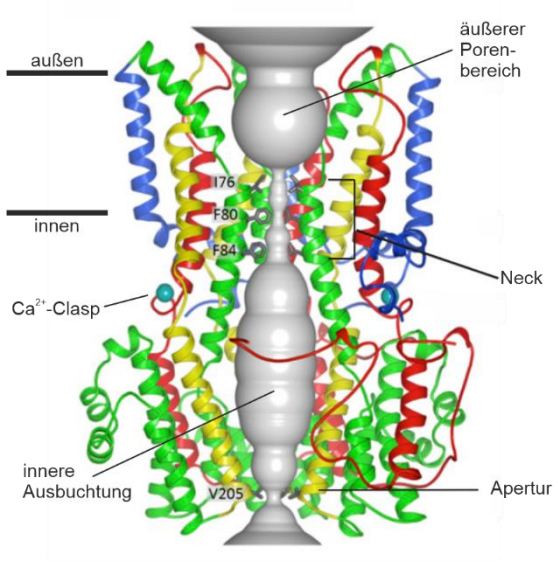


Abbildung 2: Strukturmodell des Hühnchen-BEST1 nach Vaisey et al. 2016

Röntgenkristallstruktur-Modell des Hühnchen-BEST1 mit der Darstellung der Ionenpore in grau als Abstand von der Mittelachse zum nächstgelegenen Van-der-Waal-Proteinkontakt. Zur besseren Übersicht sind nur drei der fünf Untereinheiten als Bändermodell dargestellt. Sekundäre Strukturelemente wurden in vier Segmente (S) mit korrespondierenden Transmembrandomänen gegliedert (S1 blau, S2 grün, S3 gelb, S4 und C-Terminus rot). Ca^{2+}-Ionen liegen als türkise Kugeln in ihrer spezifischen Bindungsstelle. Die kritischen Aminosäuren der Neck- und Apertur-Region sind gesondert hervorgehoben. Zudem ist die ungefähre Lokalisation der Plasmamembran angezeigt.

1.4.3.2 Expression und Funktion von BEST1

BEST1 kommt beim Menschen vor allem in neuronalem Gewebe vor. Mittels Northern Blot Untersuchungen wurde hauptsächlich die Expression in der Netzhaut nachgewiesen. Zudem konnten geringere mRNA-Mengen in Gehirn und Rückenmark detektiert werden (Petrukhin et al. 1998). Weitere Analysen zeigten das Vorhandensein des Proteins exklusiv in der basolateralen Plasmamembran des RPEs (Marmorstein et al. 2000; Marmorstein und Kinnick 2007). Trotz des sehr begrenzten Vorkommens im menschlichen Organismus werden dem Protein viele Funktionen zugeordnet. Primär ist es an der Regulation des Chloridhaushalts der RPE-Zellen beteiligt und sorgt hier für einen basalen Ausstrom von apikal aufgenommenen Cl^--Ionen (Sun et al. 2002). Eine Ca^{2+}-Aktivierung ist hierfür notwendig (Kranjc et al. 2009; Xiao et al. 2010), eine pH-Abhängigkeit der Aktivierung konnte nicht nachgewiesen werden (Elverson et al. 2023a). Im Zusammenhang mit der Cl^--Leitfähigkeit scheint BEST1 auch in Regulationsprozesse des Zellvolumens eingebunden zu sein (Milenkovic et al. 2015; Fischmeister und Hartzell 2005). Hypoosmolare Lösungen führen im HEK-Überexpressionssystem zu einer starken Zunahme der Chloridleitfähigkeit (Fischmeister und Hartzell 2005). Zudem besteht starke Evidenz, dass BEST1 eine Rolle als Regulator im intrazellulären Ca^{2+}-Signalweg einnimmt (Singh et al. 2013; Marmorstein et al. 2015; Cordes et al. 2020). Unterstützt wird diese Hypothese durch das Vorkommen des Proteins in der Membran des

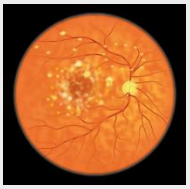
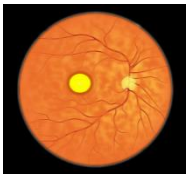
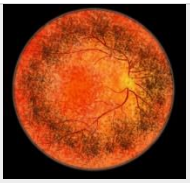
Endoplasmatischen Retikulums (ER), dem Calciumspeicher der Zelle sowie der nachgewiesenen Modulation von spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen in der Zellmembran (Milenkovic et al. 2011a; Reichhart et al. 2010; Yu et al. 2008; Barro-Soria et al. 2010; Neussert et al. 2010).

1.4.3.3 Mutationen in *hBEST1*

Insgesamt sind mehr als 350 verschiedene Mutationen in *hBEST1* in der Human Gene Mutation Database (aufgerufen Januar 2024) beschrieben. Je nach Lokalisation und Art von Mutationen können aus einer Fehlfunktion von BEST1 verschiedene Netzhaut-Erkrankungen entstehen. Dabei zeigen sich auf molekularer Ebenen sowohl loss-of-function Mutationen, dominant-negative Effekte bei denen die fehlerhaften Proteine die Funktion des Wildtyps beeinträchtigen sowie auch gain-of-function Mutationen (Amato et al. 2023). Generell können Mutationen so in verschiedene Klassen eingeteilt werden, welche in **Tabelle 1** (modifiziert nach Nachtigal et al. 2020) übersichtlich dargestellt werden. Verschiedene Mutationstypen führen hierbei zu unterschiedlichen pathologischen Mustern (Nachtigal et al. 2020), wobei anhand des Genotyps nicht immer sicher auf eine bestimmten Phänotyp geschlossen werden kann und gleiche Mutationen in verschiedenen Patienten zu unterschiedlichen Manifestationen führen können (Nowomiejska et al. 2022). Funktionell wurden neben einer beeinträchtigten Cl^--Leitfähigkeit (Yu et al. 2006; Marchant et al. 2007; Yu et al. 2007; Moshfegh et al. 2016) und unterschiedlicher Proteinstabilität (Milenkovic et al. 2018; Milenkovic et al. 2019) auch die Fehllokalisation einiger mutierter Proteine (Johnson et al. 2014; Milenkovic et al. 2011b) sowie unterschiedliche Abbauwege, je nach Mutationsklasse (Milenkovic et al. 2018) beschrieben. Zur Untersuchung der Effekte auf zellulärer Ebene wurden dabei initial zumeist Überexpressionsstudien an Human embryonic kidney (HEK) Zellen durchgeführt. Aufgrund des unpolaren Charakters dieser Zelllinie blieb synthetisiertes Protein dabei aber häufig intrazellulär (Sun et al. 2002; Hartzell et al. 2008). Inzwischen erfolgten allerdings auch erste Untersuchungen im nativen System aus von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen generierten RPE-Zellen (hiPSC-RPE) (Li et al. 2017; Liu et al. 2020; Moshfegh et al. 2016). Ein weiteres Analysesystem stellen Madin Darby Canine Kidney II (MDCKII)-Zellen dar, welche stabil mit BEST1 transfizierbar sind und dieses durch polares Wachstum auch an die

Plasmamembran transportieren können (Davidson et al. 2009; Milenkovic et al. 2011b; Johnson et al. 2014).

Tabelle 1: Mutationsklassen des *hBEST1* nach Nachtigal et al. 2020

Mutation	Charakteristik	Erkrankung	Fundoskopie
Klasse 1	Vollständiger Syntheseausfall von BEST1 z.B. verursacht durch vorzeitiges Stoppcodon	ARB	
Klasse 2	Synthese erfolgt regelhaft vorzeitiger Proteinabbau im ER aufgrund von Instabilität		
Klasse 3	Normaler Syntheseablauf Protein passiert ER ohne Degradation Abbau in nachfolgenden Zellorganellen (Golgi-Apparat, Lysosomen)	BVMD	
Klasse 4	Synthese des mutierten Proteins und Transport an die Zellmembran Fehlende/ nicht ausreichende Cl^--Leitfähigkeit der Kanäle mit mutierten Untereinheiten (dominant negativer Effekt)		
Klasse 5	Synthese, Transport an Zellmembran und Einbau von BEST1 in Kanäle erfolgt regelhaft Unregulierter Cl^--Transport aufgrund von defekten Gating-Mechanismen	ADVIRC	

Die Abbildungen aus Spalte 4 stellen klassische fundoskopische Befunde der jeweiligen Erkrankung dar (modifiziert nach Singh Grewal et al. 2021)

1.5 Bestrophinopathien

Das in Bestrophinopathien ursächlich mutierte Gen *hBEST1* wurde 1998 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen identifiziert und charakterisiert (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998). Es befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und codiert in 11 Exonen für ein 585 Aminosäuren langes und ca. 677 kDa schweres Protein, das nach intensiver weiterer Forschung inzwischen vor allem als Ca^{2+}-aktivierter Chloridkanal angesehen wird (siehe Kapitel 1.4.3.2). Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt führen Mutationen des *hBEST1*-Gens allerdings nicht zwangsläufig immer zum selben pathologischen Phänotyp. Im Groben lassen sich drei bis vier verschiedene Entitäten unterscheiden, die in den letzten Jahren mit einer Fehlfunktion von BEST1 in Verbindung gebracht wurden (Marmorstein et al. 2009;

Smith et al. 2019). Die autosomal-dominante Best´sche vitelliforme Makuladegeneration (BVMD), die autosomal-dominante altersabhängige vitelliforme Makuladegeneration (AVMD), die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) und die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (ARB) (Krämer et al. 2000; Marchant et al. 2007). Aufgrund der charakteristisch starken Ähnlichkeit zwischen der BVMD und AVMD und hauptsächlichen Unterscheidung anhand des Erkrankungsalters, ist dabei nicht vollständig geklärt, ob diese beiden Erkrankungen tatsächlich eine eigene Genese aufweisen, oder eher die gleiche Entität in unterschiedlichen Ausprägungsgraden besitzen. Hin und wieder werden auch gewisse Assoziationen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Retinitis pigmentosa und einer *hBEST1*-Mutation gezogen (Davidson et al. 2009).

1.5.1 BVMD

BVMD (auch Morbus Best genannt) ist die häufigste vorkommende Bestrophinopathie. Zuerst beschrieben wurde sie 1905 von dem deutschen Arzt Friedrich Best in einer Familie mit gehäuft auftretender langsam progredienter Makuladegeneration. Die Erkrankung wird grundsätzlich autosomal-dominant vererbt, weist aber eine variable Expressivität und unvollständige Penetranz auf (Boon et al. 2009). Meist sind dabei beide Augen betroffen, erste Symptome können bereits zwischen dem ersten und zweiten Lebensjahrzehnt auftreten und äußern sich mit einem eingeschränkten Visusverlust bei erhaltenem Farbsehvermögen (Altschwager et al. 2017). Eine Charakterisierung anhand von verschiedenen Stadien ist unter anderem fundoskopisch möglich und wird in **Abbildung 3** veranschaulicht (Lorenz und Preising 2005). Die Stadien müssen dabei nicht immer in der gleichen Reihenfolge durchlaufen werden, ebenso wenig zeigt sich immer ein progredienter Verlauf. Auch korrelieren die Befunde der Makula oft schlecht mit der verbleibenden Sehkraft (Lorenz und Preising 2005). Neben der Fundoskopie stehen noch weitere diagnostische Kriterien zur Verfügung. Eine genetische Testung verifiziert üblicherweise den anamnestischen Verdacht. Typische wegweisende Befunde zeigen ein normales Elektroretinogramm (ERG) bei einem pathologischen Elektrookulogramm (EOG). Konkret wird im EOG anhand einer Potentialdifferenz zwischen vorderem und hinterem Augenpol die Reaktion des Auges auf einen Lichtreiz nach erfolgter Dunkeladaptation überprüft. Das Verhältnis zwischen dem dunkeladaptierten („dark trough“) und helladaptierten Wert

(„light peak“) wird in der Arden Ratio angegeben, welche bei M. Best Patienten typischerweise pathologisch ist (Creel 2019). Zusätzlich kann eine optische Kohärenztomographie (OCT) veranlasst werden, wodurch die Schichtung des hinteren Augenpols beurteilt werden kann. Hier zeigt sich, ähnlich wie in der Fundoskopie, das Ausmaß der vitelliformen Läsionen (Liutkevičienė et al. 2012; Bianco et al. 2024). Diese Läsionen stellen am ehesten die Ablagerung von zellulären Abfallprodukten dar, welche aufgrund der verminderten Funktionalität des RPE vermehrt gebildet und gesammelt als Lipofuszin bezeichnet werden (Marmorstein et al. 2009).

Auch die AVMD ist durch vitelliforme Läsionen in der Makula gekennzeichnet, tritt dabei allerdings erst im höheren Lebensalter auf. (Allikmets et al. 1999; Krämer et al. 2000). Da die Schwere der Erkrankung bei BVMD sehr variabel ausfallen kann, ist nicht auszuschließen, dass es sich im Fall einer AVMD-Diagnose nur um einen besonders milden Verlauf einer BVMD handelt (Marmorstein et al. 2009).

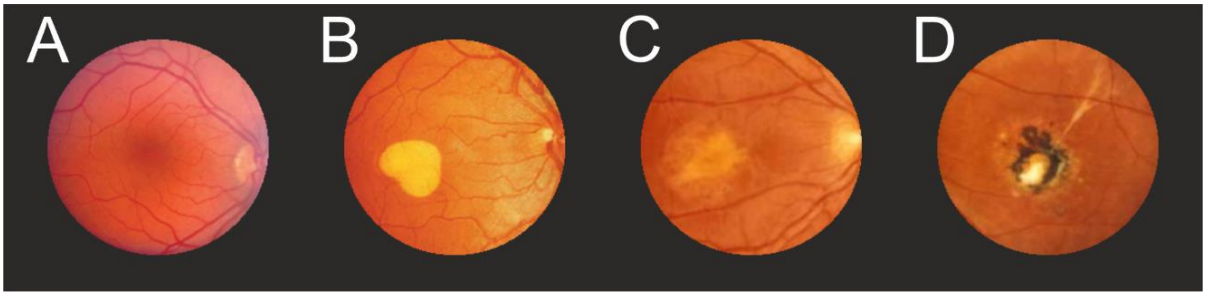


Abbildung 3: Stadien der BVMD

Mithilfe von farb-fundoskopischen Aufnahmen kann bei der BVMD eine Einteilung in Stadien erfolgen. Hier werden charakteristische retinale Läsionsmuster gezeigt. **(A)** Normale Fundoskopie der Netzhaut, wie sie für gesunde Augen oder BVMD-Patienten im prävitelliformen Stadium typisch ist. Im späten prävitelliformen Stadium können dann erste Granula in der Netzhaut ersichtlich werden. **(B)** Vitelliformes Stadium: eine meist einzelne eidotterähnliche Läsion im Bereich der Fovea centralis tritt auf. **(C)** Pseudohypopyones Stadium: durch partielle Resorption zeigt sich bildmorphologisch eine rühreiähnliche Veränderung. **(D)** Vitelliruptives Stadium: durch Atrophie und Fibrosierung verursachte gliale Narbe, welche zum Teil von Neovaskularisation begleitet werden kann. Sie entspricht dem Endstadium der BVMD mit starker visueller Einschränkung. (Abbildung modifiziert nach Hartzell et al. 2005 (A und B) und Marmorstein et al. 2009 (C und D))

1.5.2 ADVIRC

Initial im Jahr 1982 durch Kaufman et al. beschrieben, stellt die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie eine Sonderform der Bestrophinopathien dar. Im Gegensatz zur BVMD treten hier Veränderungen nicht in der Makula, sondern eher in den peripheren Bereichen der Netzhaut auf (siehe **Tabelle 1**). Dabei zeigen sich vor allem Pigmentveränderungen, helle Flecken, zystoide Ödeme und retinale

Neovaskularisationen, die zudem zu Einblutungen in den Glaskörper führen können. Auch verbunden ist die ADVIRC mit einem früh einsetzenden Katarakt. Patienten bemerken vor allem eine Verschlechterung der Sehkraft bei milder Hyperopie (Johnson et al. 2017).

1.5.3 ARB

Wie bereits aus dem Namen der autosomal-rezessiven Bestrophinopathie (ARB) ersichtlich, folgt diese Erkrankung einem autosomal-rezessiven Erbgang. Burgess et al. beschrieben 2008 zum ersten Mal diesen weiteren Phänotyp BEST1-assoziierter Erkrankungen. Patienten weisen oft einen zusammengesetzt heterozygoten Genotyp mit zwei unterschiedlich mutierten Allelen des *hBEST1* auf und zeigen bereits sehr früh einen signifikanten Sehverlust, häufig im ersten Lebensjahrzehnt. Pathophysiologisch treten zentral seröse Ablösungen der Netzhaut mit anschließender Fibrosierung auf, welche in einer subretinalen Narbe resultieren (siehe **Tabelle 1 Spalte 4 Reihe 1-2**). Auch Neovaskularisationen sind regelhaft zu finden. Die Erkrankung scheint dabei am ehesten den humanen „null“-Phänotyp zu repräsentieren, der die Effekte des vollständigen Fehlens von BEST1 zeigt (Davidson et al. 2011).

1.6 Therapie von Bestrophinopathien

Eine kausale Therapie oder Heilung der BVMD, oder den anderen *hBEST1* assoziierten Erkrankungen, ist bislang nicht möglich. Dennoch gibt es inzwischen einige experimentelle Ansätze, bei denen Erfolge erzielt werden konnten. Neben der Suche nach wirksamen Medikamentengruppen steht vor allem auch die Gentherapie im Mittelpunkt des Interesses, da das Auge als immunsupprimierter und durch die Blut-Netzhaut-Schranke gut abgegrenzter Bereich eine privilegierte Stellung einnimmt und sich daher für Gentherapie und zellbasierte Therapien eignet (Amato et al. 2023). Besonders die einfache Zugänglichkeit für Monitoring und operative Manipulationen sowie die ideale Vergleichbarkeit mithilfe des kontralateralen Auges sind hier hervorzuheben (Milenkovic et al. 2020; Yang et al. 2015; Grisanti 1998).

1.6.1 Gentherapie

Bei der Gentherapie werden zwei Ansätze unterschieden. Die Genersatztherapie, bei welcher Kopien des wildtypischen *hBEST1*-Gens in die Zellen eingeschleust werden, stellt vermutlich einen guten Behandlungsansatz für die ARB mit Klasse 1 Mutationen dar. Hier fällt bereits die Synthese des Proteins aus (Li et al. 2017; Guziewicz et al. 2018). Für diese Erkrankung existiert ein erfolgreiches Hundemodell, welches ein gutes Pendant zur humanen ARB darstellt (Guziewicz et al. 2007). Auch bei Klasse 2 Mutationen könnte sich grundsätzlich eine gewisse Verbesserung durch Addition einer Genkopie zeigen (Guziewicz et al. 2018). Für die durch anfallende Abfallprodukte beim Abbau von fehlerhaft synthetisierten BEST1-Proteinen gestressten Zellen, wäre es allerdings vermutlich zusätzlich vorteilhaft, wenn die endogenen mutierten Allele durch CRISPR/Cas9-Technik inaktiviert würden. Diese Kombinationstechnik wurde bereits einmal erfolgreich in einem Mausmodell für Retinitis pigmentosa getestet (Tsai et al. 2018). Beide Ansätze sind auch für autosomal-dominante Mutationen denkbar. Durch Zuführung zusätzlicher nativer BEST1-Untereinheiten könnten prozentual mehr funktionstüchtige Kanäle gebildet und der dominant-negative Effekt mutierter Untereinheiten somit abgeschwächt werden (Ji et al. 2019b). Generell könnte hier auch eine gezielte Inaktivierung des mutierten Allels zu einer ausreichenden Funktionalität des RPE führen, da heterozygote Träger von rezessiven Mutationen phänotypisch gesund sind (Milenkovic et al. 2020). Auch hierfür wäre wieder der Einsatz der CRISPR/Cas9-Technik zu erwägen. Zhao et al. postulierten 2021, dass eine Kombination aus exogenem Genersatz und endogener Geninaktivierung eine universelle Behandlungsmethode für alle Bestrophinopathien darstellen kann, da hierbei unabhängig von den ursprünglichen molekularen pathogenen Mechanismen wieder funktionsfähige Kanäle gebildet werden können. Limitiert werden diese Ansätze bislang vor allem durch eine noch nicht ausreichend nachgewiesene Spezifität der Genschere, da diese zum einen hochspezifisch das kranke vom gesunden Allel unterscheiden muss und zusätzlich keine unspezifischen Schnittstellen („Off-Targets“) im restlichen Genom aufweisen darf (Milenkovic et al. 2020; Zhang et al. 2015). Beide Ansätze sind Gegenstand aktueller Forschung, die mit Sicherheit innerhalb der nächsten Jahre noch interessante Ergebnisse liefern werden.

1.6.2 Medikamentöse Therapieansätze

Auch im Rahmen einer gezielten medikamentösen Therapie ist die Kenntnis von Pathomechanismen der verschiedenen Mutationen eine wichtige Grundlage. Generell lässt sich sagen, dass bei Klasse 1 Mutationen nur Wirkstoffe in Frage kommen, die das Überlesen eines Stopp-Codons ermöglichen. Bei Klasse 2 und 3 Mutationen wäre der Einsatz von chemischen Chaperonen sinnvoll, welche als Korrektoren die Faltung der Proteine unterstützen und somit deren Instabilität verbessern. Bei Klasse 4 Mutationen hingegen stellt der Einsatz von Potentiatoren der Kanalfunktion eine grundsätzliche Therapieoption dar, da hierbei die Öffnungswahrscheinlichkeit und Öffnungsdauer der Pentamere verbessert werden muss. Zuletzt bei Klasse 5 Mutationen wäre das genaue Gegenteil notwendig, weil hier die vermehrt aktiven Kanäle in ihrer Funktionalität eingeschränkt werden müssten, um eine Verbesserung des Krankheitsbilds zu erzielen (Milenkovic et al. 2020). Einen eher unspezifischen Ansatz verfolgten Singh et al. im Jahr 2015. Sie konnten an BVMD abgeleiteten hiPSC-RPE Zelllinien eine Verbesserung der Fotorezeptoraußensegment-Degradation durch die Behandlung mit Valproinsäure und Rapamycin erzielen. Die beiden Medikamente gehören in den Bereich von Proteolyseaktivatoren und Autophagieinduktoren und verbessern somit bestimmte Funktionen des RPE. Nur ein Jahr später veröffentlichten Uggenti et al. Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit von Bortezomib und 4-PBA (4-Phenylbutyrat) auf autosomal-rezessive Mutationen. Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib zeigte in Kombination mit dem chemischen Chaperon 4-PBA neben einer Erhöhung der intrazellulär lokalisierten Menge an BEST1-Untereinheiten auch eine leichte Verbesserung der korrekten Lokalisation des BEST1-Kanals, womit diese beiden Wirkstoffe vor allem bei Klasse 2 und 3 Mutationen ein vielversprechendes Therapiekonzept bieten könnten. Liu et al. konnten 2020 dann die Wirksamkeit von 4-PBA auch in einigen autosomal-dominanten sowie weiteren autosomal-rezessiven BEST1-Mutationen bestätigen. Anhand dieser Ergebnisse zeigten Elverson et al. 2023 weitere Wirkstoffe, die potentiell an der gleichen Bindungsstelle wie 4-PBA intervenieren können. Der Phosphodiesterase-5 Inhibitor Tadalafil erzielte hierbei eine signifikante Verbesserung der Chloridleitfähigkeit bei der ARB-assoziierten Mutation p.M325T im HEK297T-Überexpressionssystem. Trotz dieser vielversprechenden Ansätze, bleiben weitere Pathomechanismen zu berücksichtigen, die bislang nicht medikamentös adressiert werden können. So ist bislang z.B. noch kein Potentiator der Kanalfunktion bekannt, welcher eine Therapieoption der Wahl bei Klasse 4 Mutationen

darstellen könnte. In einem eigens am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg entwickelten Hochdurchsatz-Screening wurde eine Plattform entwickelt, bei der viele Wirkstoffklassen zeitgleich untersucht wurden (Dürr 2020). Über 2500 verschiedene Wirkstoffe einer kommerziell erworbenen Verbundbibliothek wurden so bezüglich ihrer Korrektor- oder Potentiator-Funktionalität auf mutantes BEST1 getestet. Dabei konnte ein erster vielversprechender Potentiator-Wirkstoff detektiert und charakterisiert werden.

1.7 Ziel der Arbeit

Als Teil der Identifizierung einer potentiell vielversprechenden Wirkstoffgruppe für mutiertes BEST1 am Institut für Humangenetik, ist es erforderlich die Wirksamkeit der gefundenen Substanz und deren Derivate in weiteren Experimenten zu überprüfen. Dazu sollte die Chloridkanalfunktion bzw. der Grad der Verbesserung der mutierten Chloridkanalfunktion mittels der Patch-Clamp Technik bestimmt werden. Im Vorfeld aus Hautbiopsien von gesunden Spendern und an BVMD erkrankten Patienten generierte hiPSC-RPE Zelllinien wurden für diese Analysen verwendet. Zusätzliche Kontrollen wurden durch die Modifikation der nativen *hBEST1*-Linie mittels CRISPR/Cas9-Technik hergestellt. Dabei wurde einmal ein *hBEST1* Knock-out Zellmodell sowie ein *LRRC8A* Knock-out Zelllinie generiert. Ziel der Arbeit war nun in einem ersten Schritt die Leitfähigkeit der verschiedenen Kontrollzelllinien und einer Patienten-abgeleiteten RPE-Zelllinie (hiPSC-RPE BEST +/R218C) zu charakterisieren. Im nachfolgenden Schritt sollte dann die Verbesserung der Kanalfunktion unter Einfluss des Medikaments bestätigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Allgemein regelmäßig in dieser Arbeit verwendete Substanzen sind nachfolgend in **Tabelle 2** zu finden.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Reagenz/Chemikalie	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat (ATP)-dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cäsiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cäsium-Methansulfonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hemi-Na-HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumhydroxid	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2 Zellkultur

2.2.1 Geräte und Materialien:

In **Tabelle 3** sind alle in der Zellkultur verwendeten Geräte und Materialien aufgelistet.

Tabelle 3: Geräte und Materialien der Zellkultur

Gerät/ Material	Hersteller/Bezugsquelle
CO_2-Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank BDK-SK1800	Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Vakuumpumpe BVC control	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Zentrifuge Sigma 2-5	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Leica DM-IL Inverted Phase Contrast Microscope 090-135.001	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Invertiertes Routine-Mikroskop ECLIPSE TE2000-S	Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokyo, Japan
Epitheliales Volt/Ohm Meter (EVOMX)	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
CASY® Zellzählgerät + Analyse-System Model TT	Roche Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland
Nucleofector™ 2b	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
Pipettierhilfe Accu-jet pro®	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette® 10 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette® 100 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette® 1000 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
10 cm Kulturschale	Corning Inc., Corning, NY, USA
25 cm^2 Kulturflasche	Sarstedt AG& Co KG, Nürmbrecht, Deutschland
6-Well-Platte	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
12-Well-Platte	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Transwell-Filter	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
15 ml Falcon	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Falcon	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen 18 mm Ø	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland

2.2.2 Substanzen und Kulturmedien

In folgenden **Tabellen 4-8** finden sich die zur Kultivierung verwendeten Substanzen und Nährmedien in ihrer jeweiligen Zusammensetzung.

Tabelle 4: In der Zellkultur verwendete Substanzen

Substanz	**Bezugsquelle**
DMEM with Earl´s Salts	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 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
MEM Non-Essential-Amino Acids Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RPMI-Medium 1640 (1x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Fetal Calf Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin (10.000 Units)/ Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco´s phosphate buffered saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
200 mM L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
50 mg/ml Gentamycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
10 mM Nicotinamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fibronectin bovine serum (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-L-Lysin Hydrobromid (0,5 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Matrix	Corning Inc., Corning, NY, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Testsubstanz RT001(10 µM)	ChiroBlock, Wolfen, Deutschland
Testsubstanz RT053 (10 µM)	ChiroBlock, Wolfen, Deutschland

Tabelle 5: Zusammensetzung von hiPSC-RPE Medium (1% KOSR)

Bestandteil	**Volumen/ Menge**	**in %**
KnockOut™ DMEM	485 ml	97%
KOSR	5 ml	1%
MEM Non-Essential-Amino Acids Solution	5 ml	1%
200 mM L-Glutamin	5 ml	1%
β-Mercaptoethanol	3,5 µl	
50 mg/ml Gentamycin	250 µl	
10 mM Nicotinamid	600 mg	

Tabelle 6: Zusammensetzung von hiPSC-RPE Medium (5% KOSR)

Bestandteil	**Volumen/ Menge**	**in %**
KnockOut™ DMEM	465 ml	93%
KOSR	25 ml	5%
MEM Non-Essential-Amino Acids Solution	5 ml	1%
200 mM L-Glutamin	5 ml	1%
β-Mercaptoethanol	3,5 µl	
50 mg/ml Gentamycin	250 µl	
10 mM Nicotinamid	600 mg	

Tabelle 7: HEK293T Kulturmedium

Bestandteil	Volumen	in %
DMEM with Earl´s Salts	450 ml	90%
Fetal Calf Serum (FCS)	50 ml	10%
Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep)	5 ml	1%

Tabelle 8: Y79 Kulturmedium

Bestandteil	Volumen	in %
RPMI- Medium 1640 (1x)	450 ml	90%
Fetal Calf Serum (FCS)	50 ml	10%
Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep)	5 ml	1%

2.2.3 Kultivierung verschiedener Zelllinien

2.2.3.1 hiPSC-RPE Zellen

Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) können aus Hautbiopsien durch Reprogrammierung von Fibroblasten gewonnen werden. Durch spezifische Ausdifferenzierung ist es möglich aus diesen hiPSC andere humane Gewebe zu generieren, so auch zum Beispiel die gewünschten Zellen des humanen retinalen Pigmentepithels (RPE) (Buchholz et al. 2013).

Sieben dieser hiPSC-RPE Zelllinien wurden im Vorfeld am Institut für Humangenetik nach dem Protokoll von Brandl et al. 2014 mit geringen Modifikationen generiert. Zwei davon stammen von gesunden Probanden (BEST+/+), während fünf weitere von molekular diagnostizierten Morbus Best-Patienten abgeleitet wurden. Zusätzlich wurden mittels CRISPR/Cas9-Technik zwei Knock-out Linien aus einer Zellkultur eines gesunden Spenders generiert. In einer Zelllinie wurde das *hBEST1*-Gen entfernt (BEST-/-), sodass keine Expression von BEST1 stattfindet, in einer zweiten wird BEST1 endogen exprimiert, jedoch fehlt der volumensensitive Chloridkanal LRRC8A (LRRC8A-/-), welcher nativ ebenfalls in RPE-Zellen exprimiert wird (Milenkovic et al. 2015). Im Rahmen dieser Arbeit beschränkt sich die Untersuchung von elektrophysiologischen Eigenschaften auf eine hiPSC-RPE Zelllinie eines gesunden Probanden und allen daraus entstandenen modifizierten Linien sowie der Patientenzelllinie, bei der die Mutation R218C im heterozygoten Zustand vorliegt. Grundlegende Eigenschaften dieser zuvor generierten Zelllinien sowie Ergebnisse

einer Sanger-Sequenzierung zur Verifizierung der Genotypen können **Tabelle 9** entnommen werden.

Tabelle 9: Verwendete hiPSC-RPE Zelllinien

Bezeichung	Geschlecht	Alter	Klinischer Befund	Exon	Nukleotid-Austausch	Amino-säure-Aus-tausch
hiPSC-RPE BEST1 +/+	M	29	gesund		Referenz	
hiPSC-RPE BEST1 -/-	M	29	BEST1 Knock-out			
hiPSC-RPE BEST1 +/+ LRRC8A -/-	M	29	LRRC8A Knock-out			
hiPSC-RPE BEST1 +/R218C	M	36	M. Best	6	c.652C>T	p.Arg218C

2.2.3.1.1 Kultivierung

Zur Kultivierung wurden hiPSC-RPE aufgetaut, zweimal passagiert und zur Polarisation mindestens 4 Wochen auf Transwell-Filtern kultiviert. Für die Passagierung erfolgte eine Behandlung mit TrypLE™. Gelöste Zellen wurden anschließend für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in frischem hiPSC-RPE Medium (**Tabelle 5**) aufgenommen. Zellkulturplatten und Transwellfilter waren hierfür mit Matrigel® beschichtet. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage.

2.2.3.1.2 Vitalitätskontrolle

Die Funktionalität und Integrität des Zellrasens wurde im Lauf der Polarisationsphase mithilfe von lichtmikroskopischen Kontrollen verifiziert (Nikon Eclipse TE2000-S). Wichtige Kriterien waren die Konfluenz des Zellrasens sowie eine klassische hexagonale Form der RPE-Zellen. Mithilfe dieser Parameter wurde so die Qualität der Zellen in regelmäßigen Abständen überprüft.

2.2.3.1.3 Behandlung mit Wirkstoffen

Zur direkten Untersuchung der Effektivität eines potentiellen Medikaments zur Verbesserung der Kanalfunktion wurden Zellen 24 h vor Analyse mit zwei verschiedenen Derivaten eines am Institut für Humangenetik gefundenen Wirkstoffs behandelt. Diese wurden dem normalen Kulturmedium beim Mediumwechsel zugegeben. Der Wirkstoff RT 001 sollte dabei eine Konzentration von 5 µM erreichen, RT 053 eine Konzentration von 1 µM. Beide Derivate waren in Verdünnungen mit DMSO gelöst, sodass auch eine Kontrollbehandlung mit 1 µM und 5 µM DMSO erfolgte, um Effekte des Solvens auszuschließen.

2.2.3.2 HEK293T Zellen

HEK293T Zellen wurden standardmäßig in DMEM with Earl´s Salts versetzt mit 10% FCS und 1% Pen/Strep in 10 cm Schalen kultiviert. Die Zellen humanen embryonalen Ursprungs stammen aus der Niere und haben adhärent wachsende epitheliale Eigenschaften mit einer hohen Teilungsfähigkeit. Bei Erreichen von Konfluenz, also ca. jeden zweiten bis dritten Tag, erfolgte ein Passagieren der Zellen. Hierfür wurde der Zellrasen mit einer 10 ml Pipette von der Schale abgelöst und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Resuspension in etwa 10,5 ml HEK-Medium (Zusammensetzung siehe **Tabelle 7**) sowie eine erneute Aussaat im Verhältnis 1:5.

2.2.3.3 Y79 Zellen

Die Kultivierung von Y79 Zellen erfolgte standardmäßig in mit 10% FCS und 1% Pen/Strep versetztem RPMI-Medium in 25 cm^2 Kulturflaschen. Diese aus einem Retinoblastom stammende Zelllinie bildet größere Zellkonglomerate, die in Suspension wachsen. Bei optisch gut erkennbarer Zellaggregation erfolgte ein Passagieren im Verhältnis 1:3. Durch sanftes Auf- und Abpipettieren des Kulturmediums wurden die Zellen vorsichtig vereinzelt und je ein Drittel der Suspension auf neue Flaschen mit frischem Medium (Zusammensetzung siehe **Tabelle 8**) verteilt. Dieser Prozess erfolgte ca. zweimal pro Woche.

2.2.4 Beschichtung von Deckgläschen

Für einige Experimente mussten Zellen auf Deckgläschen ausgesät werden. Da sich Zellen auf Glas grundsätzlich relativ schlecht absetzen und kaum haften bleiben, wurden diese zuvor beschichtet. Drei verschiedene Reagenzien wurden hierzu im Rahmen der Arbeit verwendet. Die Deckgläschen wurden dabei jeweils in 6-Well oder 12-Well-Platten platziert.

2.2.4.1 Beschichtung mit Fibronectin

Zur Vorbehandlung mit Fibronectin Bovine Serum wurde eine 1:200 Verdünnung der Stocklösung in DPBS hergestellt. Pro Deckgläschen wurden dann 100 µl des Gemischs als Tropfen in die Mitte gegeben und für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Zumeist erfolgte die Inkubation allerdings über Nacht. Nach Absaugen des Fibronectin-Tropfens konnte das Deckgläschen unmittelbar zur Aussaat von Zellen verwendet werden. In derartig vorbereiteten Wells konnten sich hiPSC-RPE oder HEK293T Zellen gut absetzen.

2.2.4.2 Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Das Beschichten mit Poly-L-Lysin erfolgte in einer 1:100 Verdünnung mit DPBS. Hiervon wurden pro 12-Well 2 ml des Ansatzes zugegeben und mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Zumeist erfolgte aber auch hier eine längerfristige Inkubation über Nacht bei 8 °C. Unmittelbar vor Benutzung wurde die Substanz wieder aus dem Well entfernt und zwei Waschschritte mit DPBS durchgeführt, um eine toxische Wirkung der überschüssigen Poly-L-Lysin-Reste auf die Zellen zu verhindern. Anschließend waren die so behandelten Deckgläschen für die weitere Verwendung bereit. Diese Methode wurde sowohl in 6-Well Platten zur Transfektion von HEK293T Zellen als auch zu deren Aussaat auf Deckgläschen für Patch-Experimente in 12-Well-Platten genutzt.

2.2.4.3 Beschichtung mit Concanavalin A

Um Y79 Zellen auf eine Oberfläche fixieren zu können, kann eine Beschichtung mit Concanavalin A erfolgen. Die Beschichtungslösung wurde hierbei durch Auflösen von

Concanavalin A in 1 M NaCl (0,5% Gebrauchslösung) hergestellt. 100 µl der fertigen Verdünnung wurden dann in die Mitte eines Deckgläschens gegeben und 2 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Abnahme der 100 µl und ein Waschschritt mit Millipore-H_2O, welches ebenfalls kurz als Tropfen auf die Stelle pipettiert und anschließend abgesaugt wurde, um Überschüsse des Concanavalins zu entfernen. Daraufhin konnte das Deckgläschen für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.5 Transiente Transfektion verschiedener Zelllinen

2.2.5.1 Substanzen und Materialien

In nachfolgenden **Tabellen 10** und **11** sind die für die verschiedenen Transfektionsmethoden verwendeten Substanzen und Plasmide aufgelistet. Ebenso folgt **Tabelle 12** mit verwendeten Plasmidkonzentrationen.

Tabelle 10: Verwendete Substanzen und Kits im Rahmen von Transfektionen

Substanz	Bezugsquelle
Lipofectamin®3000 Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
OptiMEM™ Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nucleofector™ Kit V	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
Chloroquinphosphat (25 mM)	Biomol, Hamburg, Deutschland

Tabelle 11: In transienter Transfektion verwendete Plasmide

Plasmide	c(Stocklösung)
hANO1-GFP in pcDNA3	1 µg/µl
hBEST1-WT-GFP in pcDNA3	0,574 µg/µl
hBEST1-R218C-GFP in pcDNA3	1,077 µg/µl
Green Flourescent Protein (GFP) in pcDNA3	1,163 µg/µl

Tabelle 12: Eingesetzte Plasmidmenge in verschiedenen Transfektionen

Plasmidmenge	Transfektion	eingesetztes Volumen
1 µg	*hANO1*-GFP	1,12 µl
	hBEST1-WT-GFP	1,74 µl
	hBEST1-R218C-GFP	0,93 ml
	GFP	0,86 µl
	hANO1-GFP +GFP	0,56 µl + 0,43 µl
	hBEST1-WT-GFP + GFP	0,87 µl + 0,43 µl
	hBEST1-R218C-GFP +GFP	0,46 µl + 0,43 µl
1,5 µg	*hANO1*-GFP	1,69 µl
	hBEST1-WT-GFP	2,61 µl
	hBEST1-R218C-GFP	1,39 µl
	GFP	1,29 µl
	hANO1-GFP +GFP	0,84 µl + 0,64 µl
	hBEST1-WT-GFP + GFP	1,3 µl + 0,64 µl
	hBEST1-R218C-GFP +GFP	0,7 µl + 0,64 µl
2 µg	*hANO1*-GFP	2,25 µl
	hBEST1-WT-GFP	3,48 µl
	hBEST1-R218C-GFP	1,86 µl
	GFP	1,72 µl
	hANO1-GFP +GFP	1,12 µl + 0,86 µl
	hBEST1-WT-GFP + GFP	1,74 µl + 0,86 µl
	hBEST1-R218C-GFP +GFP	0,93 µl + 0,86 µl
3 µg	*hANO1*-GFP +GFP	1,5 µl + 1,29 µl
	hBEST1-WT-GFP + GFP	2,61 µl + 1,29 µl
	hBEST1-R218C-GFP +GFP	1,39 µl + 1,29 µl

2.2.5.2 Transfektion von HEK293T mithilfe der Calcium-Phosphat-Methode

Um verschiedene Kanalkonstrukte im Überexpressionssystem untersuchen zu können, wurden diese Konstrukte in HEK293T Zellen mithilfe der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Hierzu wurden die in **Tabelle 11** aufgelisteten Plasmide verwendet. Ein Vektor bestand dabei jeweils aus einem C-terminal mit Green Fluorescent Protein (GFP) markierten Protein in pcDNA3. Für die Transfektion wurden die Zellen, wie bei der Passagierung zuvor beschrieben, von 10 cm Schalen abgenommen und zu ca. 70% Konfluenz in 6-Well-Platten ausgesät. Um ein schnelleres Absetzen zu gewährleisten, wurden diese zum Teil im Voraus mit Poly-L-Lysin beschichtet. Mehrere Stunden nach Aussaat konnte mit der Transfektion begonnen werden. Hierzu wurde das vorherige Kulturmedium durch frisches Chloroquin-enthaltendes Medium ersetzt, wodurch die Zellen stimuliert wurden. Dabei

wurden pro Well insgesamt 2 ml einer 1:1000 Verdünnung von Chloroquin (25 µM Endverdünnung) verwendet. Während der 90-minütigen Inkubationszeit wurde der $CaCl_2$-Transfektionsansatz mit einer Gesamtmenge von 1-3 µg Plasmid-DNA unterschiedlicher Konstrukte vorbereitet (siehe **Tabelle 12**). Dabei erfolgte jeweils eine alleinige Transfektion eines Kanalproteins oder eine Co-Transfektion zusätzlich mit GFP im Verhältnis 1:1. In einem ersten Schritt wurde hierbei ein 250 µl Ansatz aus destilliertem Wasser, $CaCl_2$ und Plasmid-DNA, wie in **Tabelle 14** gezeigt, hergestellt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden zu bestehendem Ansatz 250 µl 2x HBS (Zusammensetzung siehe **Tabelle 13**) zugegeben und die Reaktionslösung weitere 30 min inkubiert. Nach Abschluss der Chloroquin-Aktivierung wurde das Medium von den Zellen entfernt und erneut durch 3 ml normales HEK293T-Medium ersetzt. Hierzu konnten dann die 500 µl des Transfektionsansatzes (**Tabelle 14**) langsam unter kontinuierlichem Schwenken tröpfchenweise hinzugegeben werden. Im Anschluss erfolgte eine Lagerung der Zellen über Nacht im Inkubator, sodass die Konstrukte aufgenommen und exprimiert werden konnten. Am Folgetag wurde ein erneuter Wechsel zu regulärem HEK293T-Kulturmedium durchgeführt und der Transfektionserfolg mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon ECLIPSE TE2000-S) überprüft.

Tabelle 13: Zusammensetzung des 2x HBS-Puffers

Bestandteile	**Menge**
Natriumchlorid	280 mM
Kaliumchlorid	10 mM
Natriumhydrogenphosphat	1,5 mM
HEPES	50 mM
H_2O dest.	

Tabelle 14: Transfektionsansatz der Calcium-Phosphat-Methode

Substanz	**Volumen/Masse**	**Δt**
H_2O dest.	216 µl	
2 M $CaCl_2$	31 µl	0 min
Plasmid-DNA	1-3 µg	
2x HBS	250 µl	30 min
	500 µl	

2.2.5.3 Transiente Transfektion von HEK293T Zellen mit Lipofectamin®3000

Zur Expression der gewünschten Konstrukte wurden HEK293T Zellen auch mit Lipofectamin®3000 transient transfiziert. Dazu wurden Zellen wie bei der Passagierung zuvor behandelt und zu ca. 70% Konfluenz in 6-Well-Platten ausgesät. Nach erfolgtem Anwachsen der Zellen am Boden der Wells konnte mit der Transfektion begonnen werden. Hierzu wurden zwei Ansätze in 247 µl OptiMEM™ hergestellt (siehe **Tabelle 15**). Der erste Ansatz enthielt jeweils 1-3 µg Konstrukt und 2-6 µl Enhancer P3000, der zweite Ansatz 2-6 µl Lipofectamin®3000. Im Anschluss wurde der Lipofectamin-Ansatz dem Enhancer-Ansatz zugegeben und nach kurzem Vortexen für 30 min inkubiert. Nachfolgend konnten 500 µl des fertigen Transfektionsreagenz pro Well zugegeben und über Nacht inkubiert werden. Der Erfolg der Transfektion wurde am Folgetag mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon ECLIPSE TE2000-S) kontrolliert und transfizierte Zellen 24-72 h nach Behandlung verwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Lipofectamin®3000 Transfektionsansatzes in HEK293T Zellen

Transfektionsansatz 1	**Volumen/ Menge**	**Transfektionsansatz 2**	**Volumen/ Menge**
OptiMEM™ Medium	247 µl	OptiMEM™ Medium	247 µl
Enhancer P3000	2-6 µl	Lipofectamin®3000	2-6 µl
Plasmid-DNA	1-3 µg		

2.2.5.4 Transiente Transfekion von Y79 Zellen mit Lipofectamin®3000

Um Kanäle in Y79 Zellen untersuchen zu können, wurden diese ebenfalls mit Lipofectamin®3000 transfiziert. Im Vorfeld erfolgte die Aussaat auf Concanavalin A beschichtete Deckgläschen in 6-Well-Platten. Pro Well wurden nun zwei Reaktionsansätze vorbereitet. Der erste Ansatz enthielt 247 µl OptiMEM™, 2 µl Enhancer P3000 und 1 µg Plasmid-DNA. Im zweiten Ansatz waren 247 µl OptiMEM™ sowie 2 µl Lipofectamin®3000 enthalten (siehe **Tabelle 16**). Nach Zugabe des Lipofectamin-Ansatzes zum Plasmid-Ansatz wurde das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten die gesamten 500 µl des Transfektionsreagenz langsam in ein Well zugegeben und die Zellen mindestens 24 h im Inkubator gelagert werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Lipofectamin®3000 Transfektionsansatzes in Y79 Zellen

Transfektionsansatz 1	Volumen/ Menge	Transfektionsansatz 2	Volumen/ Menge
OptiMEM™ Medium	247 µl	OptiMEM™ Medium	247 µl
Enhancer P3000	2 µl	Lipofectamin®3000	2 µl
Plasmid-DNA	1 µg		

2.2.5.5 Elektroporation von Y79 Zellen

Zur Elektroporation von Y79 Zellen wurde zunächst mithilfe des CASY® Zellzählgeräts eine Menge von ca. 1-2 Millionen Zellen aus einer Kulturflasche entnommen. Diese wurden 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Parallel erfolgte die Herstellung eines Transfekionsansatzes aus 82 µl Solution V, 18 µl Supplement 1 und 1 µg Plasmid-DNA (siehe **Tabelle 17**). Das Medium über dem Zellpellet wurde möglichst vollständig abgesaugt und die Zellen im Transfektionsansatz resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend in eine Elektroporationsküvette überführt und am Nucleofector™ 2b mithilfe des Programms X-001 behandelt. Daraufhin wurde der Transfektionsansatz in eine frische Flasche mit 5 ml Medium überführt und über Nacht inkubiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Elektroporationsansatzes

Substanz	Volumen/ Menge	Programm
Solution V	82 µl	X-001
Supplement 1	18 µl	
Plasmid-DNA	1 µg	

2.2.6 Vorbereitung von Zellen für elektrophysiologische Untersuchungen

2.2.6.1 Vorbereitung der hiPSC-RPE

Bei hier durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen mussten singulär vorliegende Zellen vermessen werden, um eine Interaktion über Zellmembrankontakte hinweg ausschließen zu können (Okada 2012). Daher wurde der auf Filter kultivierte hiPSC-RPE Zellrasen vor der Analyse vereinzelt. Hierzu wurden Filterböden ausgeschnitten und einmal in DPBS gewaschen. Anschließend wurden sie 40 min in TrypLE™ bei 37 °C inkubiert und vorsichtig von der Oberfläche gelöst. Nach Bildung eines Zellpellets durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min, wurden die Zellen in frischem 5% hiPSC-RPE Medium (siehe **Tabelle 6**) wieder vereinzelt und in Fibronectin-beschichteten 12-Well Platten zur Zwischenkultivierung ausgesät. Vitale

Zellen setzten sich bis zum Folgetag ab und konnten dann durch erneutes Ablösen mit TrypLE™ für 8 min auf gleiche Art und Weise wie am Vortag auf Fibronectin-beschichtete Deckgläschen überführt werden. Auch hierfür waren die Zellen in einem Tropfen aus 5% hiPSC-RPE-Medium inkubiert. Nach ca. 2 h wurden lose Zellen durch Zugabe von 2 ml 1% hiPSC-RPE Medium (siehe **Tabelle 5**) abgespült und elektrophysiologische Messungen an verbleibenden abgesetzten Einzelzellen konnten gestartet werden.

2.2.6.2 Vorbereitung der HEK293T Zellen

Zur Vereinzelung von HEK293T Zellen wurden diese ebenfalls auf Deckgläschen überführt. Die Glasplättchen waren dabei entweder unbeschichtet, oder mit Fibronectin Bovine Serum, oder Poly-L-Lysin vorbehandelt. Nach Entfernung des Kulturmediums erfolgte eine fünfminütige Inkubation der Zellen in 2 ml EDTA zur Bindung von Ca^{2+} und Mg^{2+}, da diese Ionen eine wichtige Rolle in der Funktionalität von Haft- und Zellkontaktproteinen darstellen. Anschließend wurden die Zellen sanft mit angewärmtem 1x Trypsin vom Boden des Wells abgelöst und die Trypsin-Reaktion mithilfe von frischem HEK-Medium abgestoppt. Bei Zellen, die bereits zur Transfektion auf Poly-L-Lysin-beschichteten Wells ausgesät waren, war dieses Vorgehen obligat notwendig, um die Zellen nicht zu schädigen. Diejenigen Zellen, welche in unbeschichteten Wells kultiviert wurden, konnten auch ohne Vorbehandlung abgelöst werden. Nach einem Zentrifugationsschritt für weitere 5 min bei 1000 rpm wurde das Zellpellet entsprechend seiner Größe in frischem HEK293T-Medium resuspendiert und auf die vorbereiteten Deckgläschen ausgesät. Nach mehrstündiger Inkubationszeit waren vitale Zellen soweit abgesetzt, dass sie für die Patch-Clamp Untersuchungen verwendet werden konnten.

2.2.6.3 Vorbereitung der Y79 Zellen

Zur Verwendung der Zellen in Patch-Clamp Experimenten und auch zur zuvor bereits beschriebenen Transfektion mit Lipofectamin®3000 wurden Y79 Zellen vereinzelt auf die beschichteten Deckgläschen ausgesät. Der Inhalt einer 25 cm^2 Kulturflasche wurde hierfür in einen 15 ml Falcon überführt und 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Je nach Größe wurde das entstandene Zellpellet in 3-6 ml frischem Medium resuspendiert. Die weitere Kultivierung erfolgte dann in 6-Well-Platten mit jeweils

einem beschichteten Deckgläschen. Pro Well wurden 2 ml Kulturmedium vorgelegt und ca. 300-400 µl der Zellsuspension zugegeben. Anschließen erfolgte eine mehrstündige Inkubation, damit die Zellen sich absetzen konnten und die Möglichkeit hatten auf den beschichteten Deckgläschen anzuhaften. Waren die Zellen nicht transfiziert, konnten die Gläschen so nach einigen Stunden bereits in den Patch-Messplatz eingebaut werden. Im Falle einer Behandlung mit Transfektionsreagenz wurde diese ebenfalls einige Stunden nach Absetzen gestartet und die behandelten Zellen 24-72 h nach Zugabe des Reaktionsansatzes vermessen.

2.3 Immunozytochemie an hiPSC-RPE Zellen

In nachfolgender **Tabelle 18** finden sich verwendete Geräte und Substanzen bei der Immunozytochemie.

Tabelle 18: Verwendete Materialien bei der Immunozytochemie

Gerät/Chemikalie	Bezugsquelle
Paraformaldehyd	VWR, Darmstadt, Deutschland
Goat Serum	Abcam, Camridge, Vereinigtes Königreich
10x DPBS	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Triton® X-100	VWR, Darmstadt, Deutschland
α-BEST1 Antikörper (polyklonal in rabbit) Verdünnung 1:250	Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland, eigens produziert
Goat α-rabbit Alexa Fluor®549 Verdünnung 1:650	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DAKO Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SuperFrost® Plus Objektträger	VWR, Darmstadt, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

Zum Nachweis der korrekten Expression und Lokalisation von BEST1 an der Plasmamembran von hiPSC-RPE Zellen wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Hierfür wurden Filterböden mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten, einmalig in DPBS gewaschen und anschließend 10 min mit 4% Paraformaldehyd in DPBS fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit DPBS wurden unspezifische Bindungsstellen mithilfe einer Blocking-Lösung (Zusammensetzung siehe **Tabelle 19**) 25 min lang gesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit der Primärantikörperlösung (Zusammensetzung siehe **Tabelle 19**) über Nacht im Kühlschrank, wodurch spezifische Bindungsstellen von BEST1 abgesättigt wurden. Am Folgetag wurde der

Primärantikörper abgenommen und erneut dreimal mit DPBS gewaschen. Im Anschluss konnte die Färbereaktion mittels der Sekundärantikörperlösung (Zusammensetzung siehe **Tabelle 19**) durch Inkubation für ca. 2 h in dunkler Umgebung gestartet werden. Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Filterböden mit DAKO Fluorescence Mounting Medium auf Objektträger überführt und mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Axioskop 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) Aufnahmen angefertigt.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Lösungen für immunzytochemische Färbungen

Lösung	Zusammensetzung	Volumen pro ml
Blocking-Lösung	Goat Serum	100 µl
	10x DPBS	100 µl
	Triton® X-100	15 µl
	H_2O dest.	785 µl
Primärantikörper-Lösung	Goat Serum	25 µl
	10x DPBS	100 µl
	Triton® X-100	5 µl
	α-BEST1 Antikörper	4 µl
	H_2O dest.	865 µl
Sekundärantikörper-Lösung	Goat Serum	25 µl
	10x DPBS	100 µl
	Triton® X-100	5 µl
	Goat α-rabbit Alexa Fluor®594	3 µl
	DAPI	3 µl
	H_2O dest.	865 µl

2.4 Patch-Clamp

2.4.1 Aufbau des Patch-Clamp Setups

Das Patch-Clamp Setup besteht aus mehreren Einzelgeräten und Materialien, die in **Abbildung 4** und **Tabelle 20** übersichtlich zusammengestellt wurden.

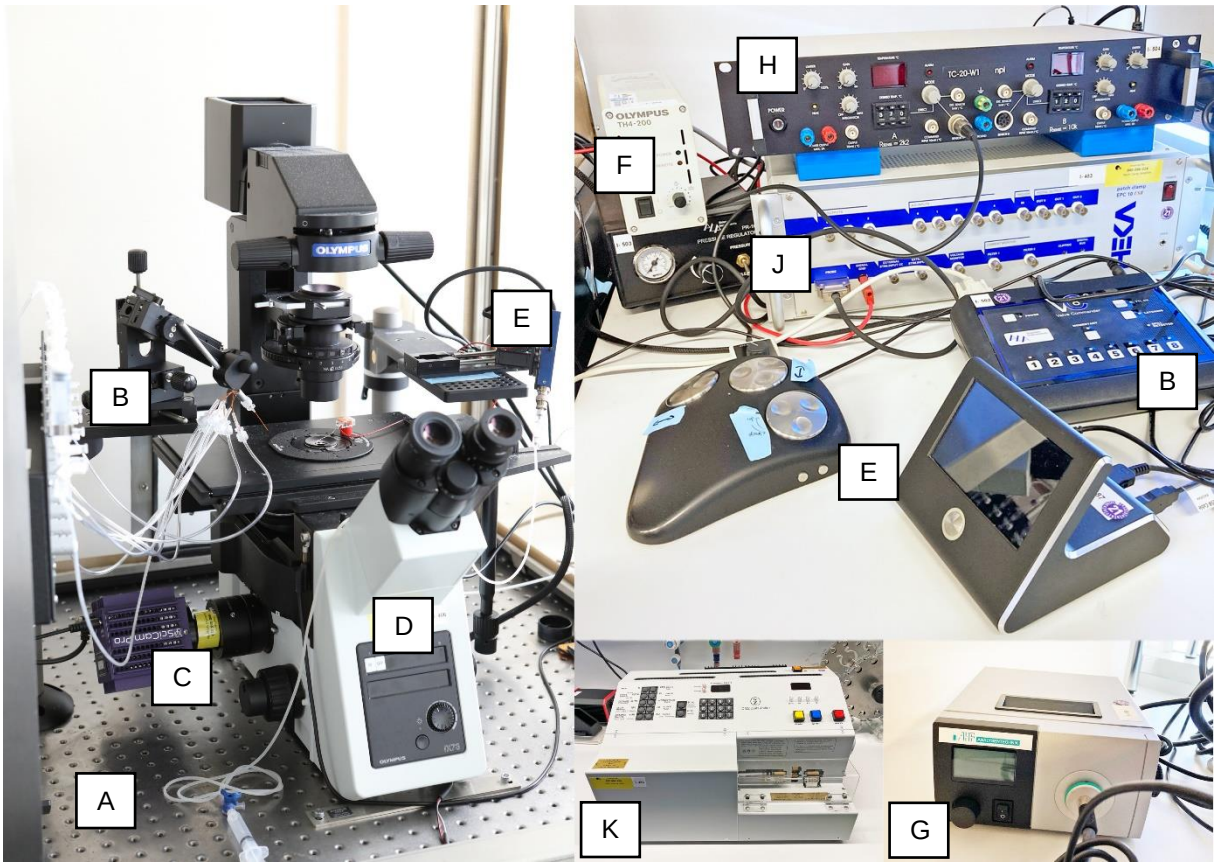


Abbildung 4: Patch-Clamp Setup am Institut für Humangenetik

Einzelkomponenten (A-K) werden nachfolgend in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Geräte und Materialien des Patch-Clamp Setups

Gerät/Material	Hersteller	Abb. 4
CleanBench Anti-Vibrationstisch mit Faraday´schem Käfig Typ II	TMC, Peabody, USA	A
Perfusionssystem ALA VC3-8xP Series mit Pressure Regulator PR-10	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA	B
Kamera SciCam Pro	Scientifica, Uckfield, Vereinigtes Königreich	C
Mikroskop Olympus IX73	Olympus, Tokio, Japan	D
UMP Mikromanipulation System	Sensapex, Oulu, Finnland	E
Durchlicht-Lichtquelle Olympus TH4-200	Olympus, Tokio, Japan	F
Fluoreszenz-LED-Lichtquelle	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland	G
Temperaturregler TC-20-WT	NPI Elektronik, Tamm Deutschland	H
EPC10 Patch-Clamp Verstärker	HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland	J
Mikropipetten-Zuggerät DMZ-Zeitz-Puller	Zeiss-Instruments, Martinsried, Deutschland	K
Vakuum Waste Kit	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA	
Osmomat 030	Gonotec, Berlin, Deutschland	
Pipettenhalter	HEKA Elekronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland	
Filamentkapillaren GB150EFT-10	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland	

Um sehr kleine Ströme im Bereich von wenigen Nanoampere (nA) messen zu können, bedarf es eines präzisen Aufbaus, da das gesamte System sehr stark auf äußere Einflüsse reagieren kann (Molleman 2002). Zur Abschirmung von elektrischen Störsignalen befindet sich ein Faraday-Käfig außen um den eigentlichen Messplatz herum. Ein inverses Mikroskop und ein Mikromanipulator sind auf dem schwingungsgedämpften Tisch montiert, welcher kleinste mechanische Störungen der Umgebung ausgleicht. An dem Mikromanipulator befinden sich ein Vorverstärker sowie ein Pipettenhalter mit Pipettenelektrode.

Die Deckgläschen, auf denen sich die zu untersuchenden Zellen in einer Badlösung befinden, werden in einer Messkammer auf dem Objekttisch des Mikroskops platziert. Zur Herstellung einer leitenden Verbindung wird eine Referenzelektrode in die Lösung eingetaucht. Diese ist über den Vorverstärker mit der Pipettenelektrode verbunden, welche sich während eines Messablaufs ebenfalls in der Messkammer befindet.

Der Vorverstärker ist an einem Hauptverstärker außerhalb des Faraday-Käfigs angeschlossen und leitet so die Signale an einen AD-Wandler, welcher diese von analogen zu digitalen Signalen transferiert, wodurch sie am Computer erkennbar werden.

2.4.2 Erreichen der Whole-cell Konfiguration

Vor jedem Messversuch wurde eine zur Pipette gezogene Glaskapillare auf den Pipettenhalter aufgesteckt und fixiert. Diese war mit einer Lösung gefüllt, die den Intrazellulärraum einer lebenden Zelle imitieren sollte. Mithilfe des Mikromanipulators konnte nun die Pipette so nahe an die zu untersuchende Zelle herangefahren werden bis ein leichter positiver Druck auf die Zellmembran ausgeübt wurde. Dies war optisch durch das Mikroskop kontrollierbar und zeigte sich durch ein leichtes Eindellen der Zellmembran. Mithilfe eines am Pipettenhalter angebrachten Schlauchs, welcher mit einer 5 ml Spritze verbunden ist, wurde dann ein Unterdruck erzeugt, sodass die Zellmembran sich aufgrund des negativen Drucks fest an die Öffnung der Glaskapillare saugte. Bei dieser sogenannten Seal-Konfiguration entstand eine leitungsfreie Verbindung zwischen Zelle und Pipette, deren Widerstandswerte sich im Gigaohmbereich (GΩ) befanden. Mittels eines kurzen starken Unterdrucks konnte anschließend die Zellmembran an dieser Verbindung eingerissen und somit die Whole-cell Konfiguration erreicht werden. Dabei wurde das Innere der Zelle komplett ausgewaschen und durch die Pipettenlösung ersetzt. Am Computer war es dann möglich den seriellen Widerstand R_S von Pipette und Zelle und die Kapazität der Zellmembran über den c-slow Wert abzulesen. Beide Werte stellten ein Qualitätskriterium der Messung dar. Stieg der serielle Widerstand im Lauf der Messung über das Drei- bis Vierfache des Pipettenwiderstands an, wurden Stromsignale am Verstärker verfälscht und die Messung damit unbrauchbar. Bei sehr großen c-slow Werten hingegen konnten kapazitive Artefakte beim Umladen der Zellmembran auf andere Spannungen entstehen, die die Aufzeichnung störten (Okada 2012).

Waren beide Werte im passenden Rahmen, konnten über die Zellmembran laufende Ströme durch die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden registriert und durch Klemmprotokolle Ströme und Spannungen angelegt werden.

2.4.3 Lösungen

Nachfolgende **Tabellen 21-23** geben Aufschluss über die verwendeten Extra- und Intrazellulärlösungen.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Extrazellulärlösung

Stoff	M (g/mol)	c (mmol/l)
Natriumchlorid	58,4	150
Cäsiumchlorid	168,36	6
Calciumchlorid	110,98	1,5
Hemi-Na-HEPES	249,3	10
Magnesiumchlorid	203,3	1
Glucose	180,156	10
Osmolarität		320 mosmol/kg (mit Mannitol)
pH		7,4 (mit NaOH und HCl)

Tabelle 22: Zusammensetzung der Intrazellulärlösung

Stoff	M (g/mol)	c (mmol/l)
Cäsiumchlorid	168,36	40
Cäsium-Methansulfonat	228	100
Calciumchlorid	110,98	x
Magnesiumchlorid	203,3	1
Hemi-Na-HEPES	249,3	10
EGTA	380,34	y
ATP-Dinatriumsalz	551,14	4
Osmolarität		290 mosmol/kg (mit Mannitol)
pH		7,2 (mit KOH und HCl)

Tabelle 23: Verschiedene Ca^{2+}-Konzentrationen in Intrazellulärlösung

Chelatormenge	freie c[Ca^{2+}] (µM)	$CaCl_2$ (mmol/l)	EGTA (mmol/l)
niedrig	0,38	2,26	3,5
	0,80	2,26	2,83
	1,20	2,26	2,6
hoch	0,38	6	10
	0,60	7	10
	0,90	7,8	10
	1,20	8,3	10
	2,40	9,1	10

2.4.4 Whole-cell Messungen an verschiedenen Zelllinien

Alle untersuchten Zelllinien wurden mithilfe des gleichen, nachfolgend beschriebenen Protokolls vermessen.

Während der Untersuchung wurden die sich auf den Deckgläschen befindlichen Zellen in isoosmotischer extrazellulärer Lösung von 320 mosmol/kg bei einem pH von 7,4 (eingestellt mit NaOH) inkubiert (Zusammensetzung siehe **Tabelle 21**). Patch-Pipetten wurden mithilfe des DMZ-Zeitz-Pullers gezogen und hatten einen Öffnungswiderstand von 3 bis 5 MΩ. Nach Erreichen der Whole-cell Konfiguration sorgte die Zusammensetzung der Pipettenlösung (siehe **Tabelle 22** und **23**) für eine Aktivierung von Cl^--Strömen durch das Vorhandensein von 4 mM ATP und unterschiedlichen Konzentrationen an freiem Ca^{2+} (berechnet nach: https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/CaMgATPEGTA-TS.htm). Diese dem Intrazellulärraum ähnelnde Lösung hatte eine Osmolarität von 290 mosmol/kg und wurde mit KOH auf einen pH von 7,2 eingestellt. Durch die Software PatchMaster v2x90.2 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) wurden spannungsgesteuerte Einwärts- und Auswärtsströme induziert. Hierfür wurden Spannungsrampen von -60 bis +120 mV mit einer Gesamtdauer von 500 ms im Intervall von zwei Sekunden angelegt. Das Ruhemembranpotential der Zellen wurde auf einen Wert von -40 mV geklemmt, während das Umkehrpotential für Chloridströme aufgrund der verwendeten Lösungen einem Wert von ca. -35 mV entsprach. Unter optischer Kontrolle wurde die maximale Aktivierung der Chloridleitfähigkeit abgewartet. Nach Erreichen eines Plateauwerts für Ein- und Auswärtsströme erfolgte ein zusätzliches Anlegen einer Strom-Spannungs-Messkurve von -60 bis +40 mV mit einem jeweiligen Zeitintervall von 50 ms pro angelegtem Spannungswert.

2.5 Datenanalyse, graphische Darstellung und Statistik

Bilder immunzytochemischer Färbungen wurden mit der Software Axio Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Deutschland) angefertigt und sonstige mikroskopische Aufnahmen mittels NIS-Elements BR 3.0 (Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokyo, Japan) veranschaulicht. Eine Beurteilung der Patchdaten erfolgte durch die Software PatchMaster v2x90.2 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland). Erfolgreich beendete Whole-cell Messungen wurden zur Auswertung in Microsoft Office (Microsoft, Redmond, WA, USA) und Sigma Plot 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) übertragen. Abbildungen und Graphen mit Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) und CorelDRAW (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) erstellt und bearbeitet. Die Signifikanz der Daten wurde

beim Vergleich zweier Gruppen jeweils mittels eines zweiseitigen, ungepaarten T-Tests überprüft. Dabei wurden Werte von $p \leq 0,05$ akzeptiert und Ergebnisse als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung (SEM) präsentiert. Zur Analyse mehrere Parameter zur gleichen Zeit erfolgte eine Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-normalverteilte Daten. Im Anschluss wurde der Post hoc Dunn´s Test zur Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg Methode angewandt. Auch hier wurden Signifikanzen ab einem adjustierten P-Wert von $\leq 0,05$ akzeptiert. Fehlende statistische Signifikanz wurde jeweils mit n.s. (nicht signifikant) gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Qualitative Beurteilung von hiPSC-RPE Zelllinien

Die im Vorfeld am Institut für Humangenetik aus Hautfibroblasten generierten hiPSC-RPE Zellen wurden im Rahmen ihres 6-wöchigen Reifungsprozesses regelhaft optisch auf die zuvor beschriebene Ausbildung eines konfluenten Zellrasens mit typischer hexagonaler Form hin überprüft (Kittredge et al. 2018; Brandl et al. 2014). Unabhängig vom Genotyp konnte diese Morphologie in allen untersuchten hiPSC-RPE Zellen detektiert werden, was als positives Qualitätskriterium gewertet wurde und für die Vitalität des Zellrasens sprach (**Abbildung 5A**).

3.2 Charakterisierung der hiPSC-RPE Zellen mittels immunzytochemischer Färbung

Die korrekte Expression und Lokalisation von BEST1 an der basolateralen Plasmamembran der RPE Zellen wurde gegen Ende des Reifungsprozesses mithilfe einer immunzytochemischen Färbung untersucht. Wildtypisches BEST1 zeigte dabei in hiPSC-RPE BEST +/+ und hiPSC-RPE LRRC8A -/- Zellen eine korrekte Lokalisation an der Plasmamembran, wodurch auch die hexagonale Form der Zellen noch einmal verdeutlicht werden konnte. Dagegen war bei der Linie hiPSC-RPE BEST -/- keine Expression von BEST1 festzustellen, wodurch diese als erfolgreich etabliertes Knock-out Modell bestätigt werden konnte. Die Patientenzelllinie hiPSC-RPE BEST +/R218C weist im Gegensatz zu vielen anderen Mutationen ebenfalls eine Lokalisation an der Plasmamembran der RPE-Zellen auf (Johnson et al. 2014; Dürr 2020; Nachtigal 2021) und stellt somit ein Modellsystem zur Überprüfung der Verbesserung der Kanalfunktion mithilfe von Potentiatorwirkstoffen dar. Immunzytochemische Bespielfärbungen der untersuchten Zelllinien sind in **Abbildung 5B** zu sehen.

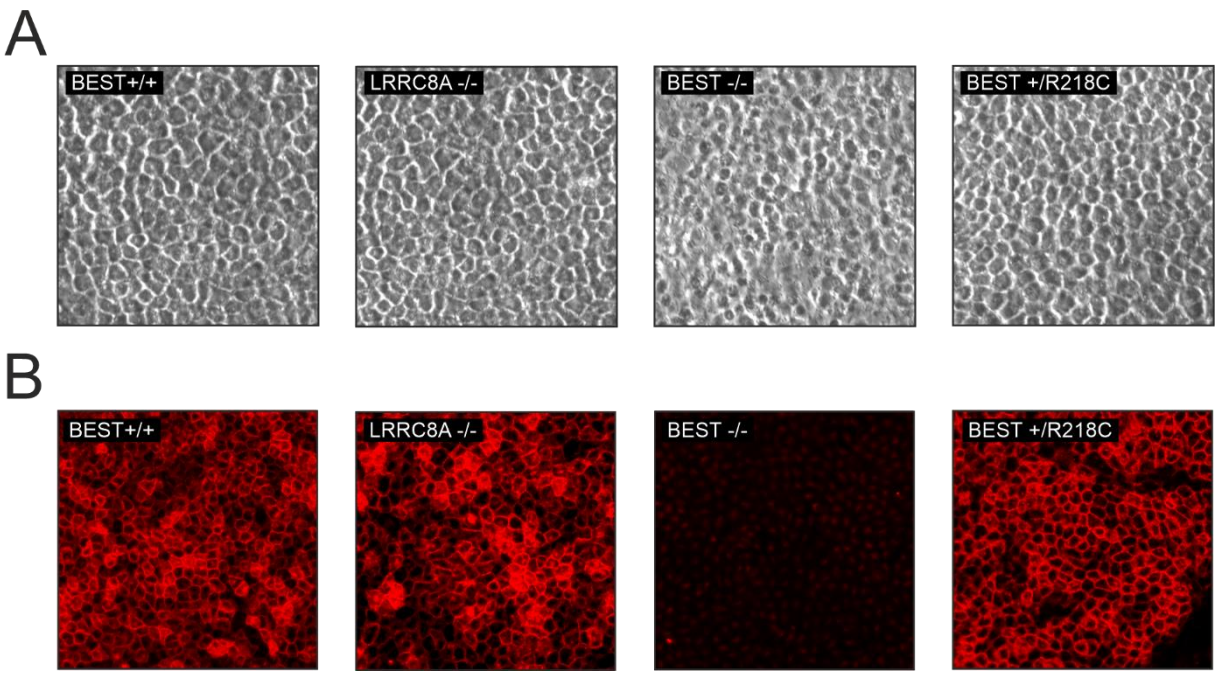


Abbildung 5: Mikroskopie und immunzytochemische Färbung von hiPSC-RPE Zellen

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zellinien **(A)** lichtmikroskopische Charakteristik von hiPSC-RPE Zellen nach 6-wöchiger Kultivierung auf Transwell-Filtern **(B)** Immunzytochemische Färbung von BEST1 mit α-BEST1-Antikörper (rot)

3.3 Funktionelle Charakterisierung der BEST1-Kanalfunktion mittels Whole-cell Messungen an hiPSC-RPE Zellen

Ziel der Untersuchung von hiPSC-RPE Zellen mithilfe der Patch-Clamp Technik war (1) die elektrophysiologische Charakterisierung der vier hiPSC-RPE Zelllinien sowie (2) der Nachweis einer Verbesserung der Kanalfunktion in der Patientenzelllinie BEST +/R218C durch die Behandlung mit Wirkstoffderivaten, welche sich kürzlich in einem Hochdurchsatz-Screening als vielversprechend herausgestellt hatten. Hierfür wurden vereinzelte Zellen in isoosmotischer Badlösung inkubiert und mithilfe der Pipettenlösung die Induktion einer Reaktion hervorgerufen. Die Pipettenlösung ähnelte dabei in ihrer Zusammensetzung dem grundsätzlichen intrazellulären Milieu und enthielt zusätzlich 4 mM ATP sowie 0,38 µM Ca^{2+} zur Aktivierung der Ca^{2+}-abhängigen Cl^--Leitfähigkeit. Derartige Ca^{2+}-Konzentrationen entsprechen dabei einer moderaten Erhöhung, da im normalen intrazellulären Milieu eine Konzentration von 50-100 nM freiem Ca^{2+} zu erwarten ist (Li et al. 2017; Zhang et al. 2018). Die hiPSC-RPE Linie BEST +/+ diente dabei als Positiv-, die BEST1 Knock-out Linie als Negativkontrolle. Die LRRC8A Knock-out Zellen stellten im Prinzip eine weitere Positivkontrolle dar,

wobei so zusätzlich gezeigt werden sollte, dass die gemessenen Effekte in BEST +/+ Zellen nicht auf den volumensensitiven Anionenkanal LRRC8A (Voss et al. 2014) zurückzuführen sind. Die Patientenzelllinie BEST +/R218C wurde sowohl mit als auch ohne vorherige Wirkstoffbehandlung vermessen. Durch das Anlegen von Spannungsrampen in regelmäßigen Abständen wurde so der Stromfluss über die Zellmembran im Zeitverlauf betrachtet und der Zeitpunkt der maximalen Aktivierung abgewartet. Zu Beginn und Ende einer Messung wurden dabei die Ein- und Auswärtsströme bei -60 bzw. +120 mV detektiert. Das durch die Ionenkonzentration der verwendeten Lösungen definierte Umkehrpotential für eine Chloridleitfähigkeit lag dabei in etwa bei -35 mV und konnte mithilfe der Nernst-Gleichung errechnet werden (Molleman 2002). Das Ruhemembranpotential der Zellen wurde vor Beginn einer Messung auf -40 mV festgesetzt.

3.3.1 Typisierung der hiPSC-RPE Zellen anhand ihrer spezifischen Kapazität

Direkt nach Erreichen der Whole-cell Konfiguration konnte die jeweilige Kapazität der Zellmembran der vermessenen Zellen ermittelt werden. Dieser Wert stellt ein indirektes Maß für die Größe der Zellen dar (Molleman 2002). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in **Abbildung 6** dargestellt. Für hiPSC-RPE BEST +/+ Zellen (schwarzer Balken) wurde dabei ein Mittel von 13,84 (±0,3) pF erreicht, hiPSC-RPE LRRC8A -/- Zellen (grauer Balken) wiesen einen Wert von 16,37 (±0,5) pF auf, während ein Knock-out von BEST1 (weißer Balken) in einem mittleren Wert von 15,06 (±0,5) pF resultierte. Zellen der Patientenzelllinie (roter Balken) lagen am nächsten am Wert des Wildtyps mit einem Mittel von 13,53 (±0,8) pF. Somit zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=1.34e-6$) zwischen dem gesunden Phänotyp und der LRRC8A Knock-out Variante. Ebenfalls trat eine signifikante Differenz zwischen BEST1 exprimierenden Zellen und dem BEST1 Knock-out Modell auf ($p=0,025$). Dagegen zeigten die gemessenen Kapazitätswerte der BEST +/+ und BEST +/R218C Zelllinien keinen Unterschied ($p=0,886$). Die signifikante Erhöhung der Zellgröße in den beiden Knock-out Modellen spricht für eine beeinträchtigte Funktion der Volumenregulation, welche in einer Zellschwellung resultiert.

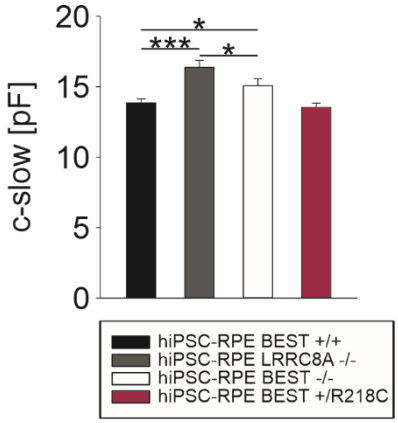


Abbildung 6: Kapazität von hiPSC-RPE Zellen

Aufgezeigt sind die Mittelwerte aller Messungen der jeweiligen Datenreihen (n≥67) mit SEM als Balkendiagramm. Signifikanzen wurden mittels des Post hoc Dunn´s Test überprüft und ab p≤0,05 (*) akzeptiert. Statistische Signifikanz wird durch p≤0,001 (***) ausgewiesen. Pro Balken ist der jeweilige mittlere c-slow Wert der einzelnen Zelllinien dargestellt, welcher als indirektes Maß für die Größe einer Zelle gilt.

3.3.2 Stromprofil von hiPSC-RPE bei 37°C mit 0,38 µM Ca^{2+}

Zunächst wurden die Stromantworten der hiPSC-RPE Zelllinien bei physiologischen Temperaturen um 37 °C und einer moderaten BEST1-Aktivierungskonzentration von 0,38 µM Ca^{2+} analysiert. Eine direkte Vergleichbarkeit wurde durch Normierung der Stromantwort erreicht. So wurden die Zellen zum einen durch ihren relativen Anstieg der Stromantwort (I_{max}/I_{min}) und zum anderen durch die gezeigte Stromdichte bezogen auf die jeweilige Größe der Zelle (I/c-slow) charakterisiert. Ergebnisse der Messreihe bei 37 °C sind in **Abbildung 7** gezeigt. Zusätzlich wurde 24 h vor Beginn der Messungen die Patientenzelllinie BEST +/R218C entweder mit DMSO als Negativkontrolle, oder einem der beiden Testderivate RT 001 oder RT 053 behandelt. Ein signifikanter Unterschied der Stromantwort in den untersuchten hiPSC-RPE Linien konnte nicht gefunden werden (p=0,97-1). Der Anstieg bei der Kontrollzelllinie BEST +/+ resultierte im Mittel in einem 7,5 (±1,2) -fachen Wert im Vergleich zur Ausgangsstrommenge. Beim LRRC8A Knock-out wurde eine Steigerung um das 7,6 (±1,4) -fache erreicht. Der BEST1 Knock-out zeigte eine 7,3 (±1,2) -fache Erhöhungen der Stromantwort, während die Werte für die unterschiedlich behandelten BEST +/R218C Zellen zwischen einer 8,7 (±0,9) und 7,0 (±1,5) -fachen Erhöhung der Ausgangsstrommenge schwankten (siehe **Abbildung 7A**). Auch die Stromdichte bei 120 mV zeigte ähnliche Ergebnisse. Zunächst war in allen Zelllinien eine signifikante bis sehr stark signifikante Steigerung des Anionenstroms im Zeitverlauf zu erkennen. Diese ist in **Abbildung 7B** jeweils durch die gepaarten Balken dargestellt. Die resultierenden Endstromhöhen der verschiedenen Zelllinien wiederum unterschieden sich nicht voneinander. HiPSC-RPE BEST +/+ Zellen erreichten im Mittel

48,2 (±6,8) pA/pF und stellten damit noch den höchsten Wert dar. LRRC8A -/- Zellen zeigten eine mittlere Stromdichte von 39,9 (±3,0) pA/pF, BEST1 Knock-out Zellen von 34,8 (±2,1) pA/pF. Damit war zwar tendenziell eine leichte Verringerung der Stromdichte zu beobachten, diese zeigte aber keine statistische Signifikanz (p=1 für LRRC8A -/- und p=0,626 für BEST -/-). Auch die Werte der hiPSC-RPE BEST +/R218C Zellen präsentierten sich auf ähnlichem Niveau und wiesen mit 36,2 (±6,9) pA/pF, 31,2 (±3,0) pA/pF und 31,9 (±5,6) pA/pF keine signifikante Differenz auf. Eine Unterscheidung unter den gegebenen Bedingungen war somit nicht möglich. Zudem konnten bereits auf Kontrollebene keine Abweichungen festgestellt werden, wodurch auch über die Wirksamkeit der Behandlung mit den Derivaten keine Aussage getroffen werden konnte.

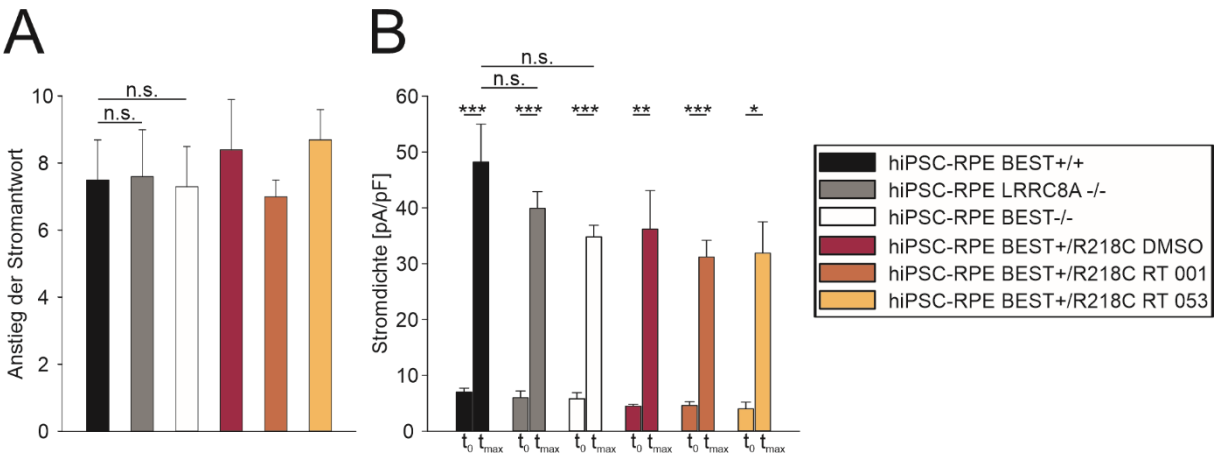


Abbildung 7: Stromanstieg und Stromdichte von hiPSC-RPE bei 120 mV und 37 °C

Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen einer Datenreihe (n≥4) mit SEM als Balkendiagramm. Unterschiede innerhalb der einzelnen Zelllinien wurden mithilfe eines zweiseitig ungepaarten T-Tests überprüft, bei dem Vergleich der verschieden Zelllinien wurde der Post hoc Dunn´s Test zur Korrektur für multiples Testen verwendet. Signifikanzen wurden akzeptiert bei p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***). **(A)** Die Balken zeigen jeweils den Anstieg der Stromantwort im Messverlauf errechnet durch Division der Strommenge zum Zeitpunkt t_{max} gegen die Strommenge zum Zeitpunkt t_0 für alle verwendeten hiPSC-RPE Zelllinien. Im Bereich der Mutation R218C wird noch einmal gesondert zwischen der Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen unterschieden. **(B)** Die Balken zeigen jeweils die Strommenge bezogen auf die Größe der vermessenen Zelle zum Anfangszeitpunkt t_0 (jeweils links) und Endzeitpunkt t_{max} (jeweils rechts) für die drei Kontrollzelllinien hiPSC-RPE BEST +/+ (schwarz), hiPSC-RPE LRRC8A -/- (grau) und hiPSC-RPE BEST -/- (weiß) sowie die Patienten-abgeleitete Linie hiPSC-RPE BEST +/R218C (rot) unter drei verschiedenen Behandlungsoptionen (DMSO, RT 001 und RT 053).

Eine Erklärung für diese Ergebnisse sind möglicherweise die großen Schwankungen der zusammengefassten Einzelmessungen in allen Zelllinien. So wurden in allen untersuchten Linien Stromspuren aufgezeichnet, in welchen die Endstromhöhen zwischen ca. 200 und 700 pA lagen. Beispielmessungen für hiPSC-RPE BEST +/+, hiPSC-RPE LRRC8A -/- und hiPSC-RPE BEST -/- werden in den **Abbildungen 8-10** dargestellt. Die Entwicklung der Stromantwort im Zeitverlauf zeigt dabei jeweils sehr unterschiedliche Anstiege (obere Teildiagramme B-D) bei gleichzeitig konstant bleibendem Umkehrpotential (untere Teildiagramme B-D). Dieses stellte eines der Qualitätskriterien der einzelnen Messungen dar und zeigte die Abwesenheit von Leckströmen an, welche die tatsächliche Stromantwort der Zelle kaschieren könnten (Dallas und Bell 2021). Messungen, bei denen das Umkehrpotential durch die Zelle nicht konstant gehalten werden konnte, wurden aus der Auswertung unmittelbar ausgeschlossen. Die in **Abbildung 8D** gezeigte Kurve des Auswärtsstroms einer BEST +/+ Zelle stellt dabei eine starke Ausnahme dar. Eine derartige Stromhöhe von über 1 nA wurde nur in dieser einen Messung beobachtet.

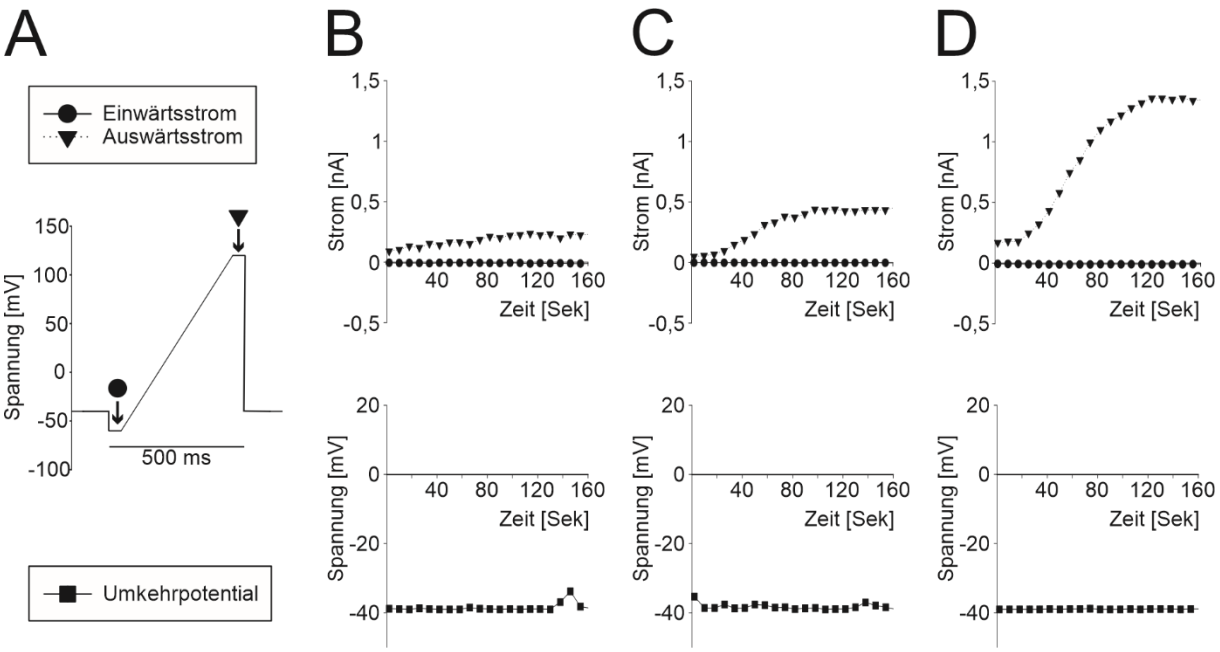


Abbildung 8: Beispielstromkurven von hiPSC-RPE BEST +/+

(A) Legende und Schema des angelegten Spannungsprotokolls. Die Pfeile markieren die Entnahmezeitpunkte für die in Kurven (B)-(D) gezeigten Ströme. **(B)-(D)** Untereinander dargestellt sind jeweils eine beispielhafte Stromkurve einer hiPSC-RPE BEST +/+ Zelle sowie deren zugehöriges Umkehrpotential. (B) stellt dabei eine der Messungen mit geringster Aktivierung dar, (C) eine Beispielkurve für eine mittlere Aktivierung und (D) die maximal erreichte Stromantwort.

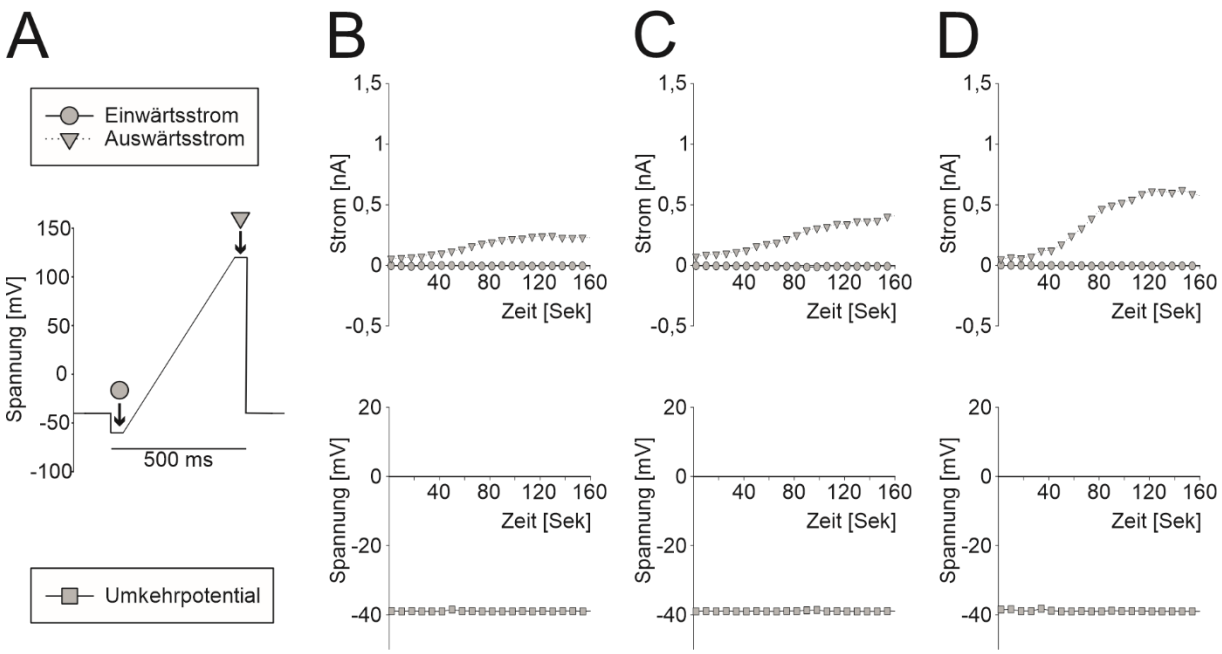


Abbildung 9: Beispielstromkurven von hiPSC-RPE LRRC8A -/-

(A) Legende und Schema des angelegten Spannungsprotokolls. Die Pfeile markieren die Entnahmezeitpunkte für die in Kurven (B)-(D) gezeigten Ströme. **(B)-(D)** Untereinander dargestellt sind jeweils eine beispielhafte Stromkurve einer hiPSC-RPE LRRC8A -/- Zelle sowie deren zugehöriges Umkehrpotential. (B) stellt dabei eine der Messungen mit geringster Aktivierung dar, (C) eine Beispielkurve für eine mittlere Aktivierung und (D) die maximal erreichte Stromantwort.

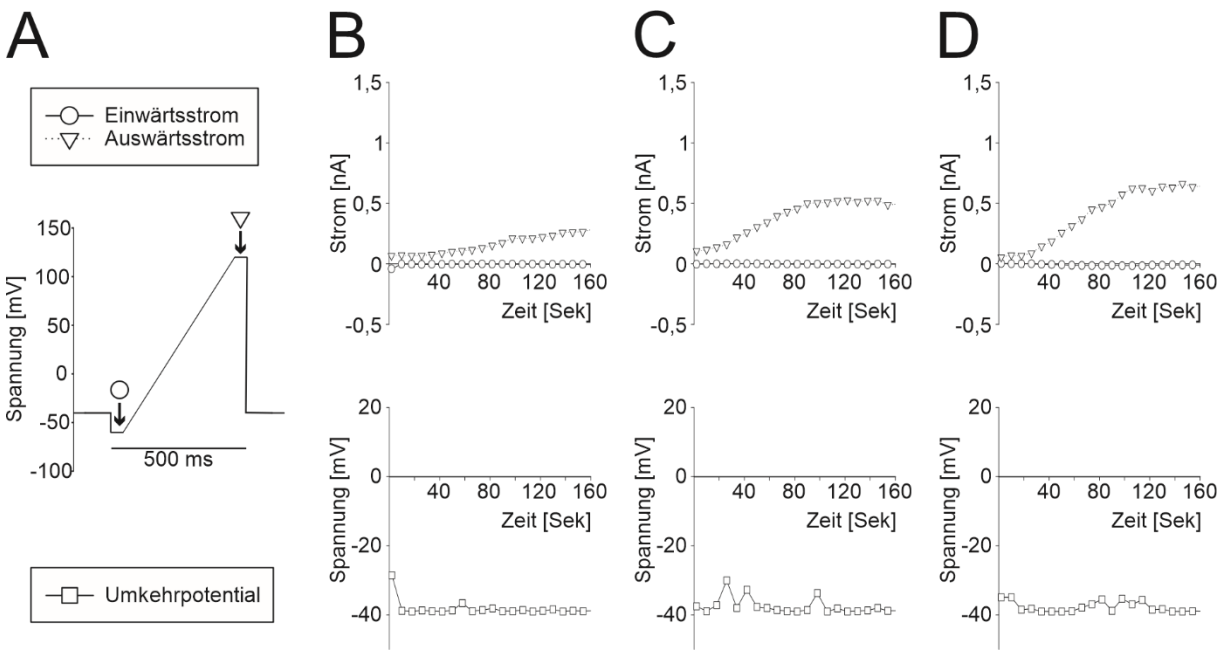


Abbildung 10: Beispielstromkurven von hiPSC-RPE BEST -/-

(A) Legende und Schema des angelegten Spannungsprotokolls. Die Pfeile markieren die Entnahmezeitpunkte für die in Kurven (B)-(D) gezeigten Ströme. **(B)-(D)** Untereinander dargestellt sind jeweils eine beispielhafte Stromkurve einer hiPSC-RPE BEST -/- Zelle sowie deren zugehöriges Umkehrpotential. (B) stellt dabei eine der Messungen mit geringster Aktivierung dar, (C) eine Beispielkurve für eine mittlere Aktivierung und (D) die maximal erreichte Stromantwort.

3.3.3 Stromprofil von hiPSC-RPE bei unterschiedlichen Ca^{2+}-Konzentrationen

Um mögliche Ca^{2+}-abhängige Aktivierungseffekte zu untersuchen, wurden Zellen der hiPSC-RPE BEST +/+ Linie unter den grundsätzlich gleichen wie zuvor beschriebenen Bedingungen, aber mit unterschiedlichen Ca^{2+}-Konzentrationen in der Intrazellulärlösung vermessen. Neben der Basiskonzentration von 0,38 µM Ca^{2+} wurden zusätzlich 0,8 µM und 1,2 µM Ca^{2+} verwendet. Da BEST1 einen Ca^{2+}-abhängigen Cl^--Kanal darstellt, sind bei höheren intrazellulären Konzentrationen größere Anstiege der Stromantwort zu erwarten (Li et al. 2017; Kranjc et al. 2009). Überraschenderweise zeigte sich das exakte Gegenteil. In **Abbildung 11** ist wieder der relative Anstieg der Stromantwort sowie die Stromdichte bei 120 mV dargestellt. Wie bereits im vorherigen Abschnitt gezeigt, erreichten hiPSC-RPE BEST +/+ Zellen einen 7,5-fachen Wert des Ausgangsstroms. Nach Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration auf 0,8 µM verminderte sich der Anstieg nicht signifikant auf einen 6,8 (±0,9) -fachen Anstieg (p=0,97). Diese Tendenz setzte sich bei weiterer Erhöhung des Ca^{2+}-Spiegels

auf 1,2 µM fort. Hier wurde nur noch eine 3,2 (±0,2) -fache Steigerungen des Ausgangsstroms beobachtet. Diese Verminderung reichte aus, um ein stark signifikantes Niveau zu erreichen (p=0,003). Beide Befunde zeigten sich konsistent in ihrer Stromdichte (vgl. **Abbildung 11B**). Wie bereits im Experiment zuvor konnte auch hier wieder eine klare Zunahme der Anionenströme im Zeitverlauf nachgewiesen werden, die unter jeder untersuchten Bedingung ein statistisch stark bis sehr stark signifikantes Niveau erreichte (**Abbildung 11B Balkenpaare**). Die in dieser Messreihe verwendeten Einzeldaten zeigten für die Konzentration von 0,38 µM Ca^{2+} dabei eine mittlere Endstromdichte von 45,7 (± 4,9) pA/pF. Im Gegensatz zum Anstieg der Stromantwort zeigte sich allerdings bei der Stromdichte bereits bei der Verwendung von 0,8 µM Ca^{2+} eine signifikante Verringerung der maximal gemessenen Ströme auf mittlere Endwerte von 26,1 (±3,2) pA/pF (p=0,017). Die weitere Steigerung auf 1,2 µM Ca^{2+} verstärkte diesen Effekt und resultierte in mittleren Werten um 21,3 (±1,9) pA/pF, wodurch sich ein statistisch stark signifikanter Unterschied zwischen 0,38 und 1,2 µM Ca^{2+} ergab (p=0,003). Begleitet wurden diese Befunde allerdings jeweils von einer Erhöhung des seriellen Widerstands im Lauf der Messungen. Diese war umso stärker ausgeprägt, je höher die verwendete Ca^{2+}-Konzentration war und erreichte zum Teil bis zu 100-fache Werte des Ausgangswiderstands. Ein derartiges Phänomen kann zum Beispiel durch das erneute Verschließen der Membran unter der Patchpipette verursacht werden und stört die Messung (Dallas und Bell 2021). Aufgrund des Ohm´schen Gesetzes muss bei gleichbleibender Spannung und Erhöhung des Widerstands eine Verringerung der Stromantwort erfolgen. Dieser geringere Wert stellt aber nicht zwangsläufig die tatsächlichen Vorgänge an der Zellmembran dar, sondern repräsentiert nur das, was der Verstärker aufnehmen kann. Eine konkrete Aussage über die tatsächlichen Stromflüsse an der Zellmembran ist so nicht möglich. Um das Problem zu umgehen, wurde versucht die Ca^{2+}-Konzentration in der Intrazellulärlösung besser zu komplexieren (Okada 2012). Daher wurden anschließend auch Lösungen mit 10 mM EGTA verwendet (siehe **Tabelle 23**). Dadurch konnte allerdings ebenso wenig eine Verbesserung erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

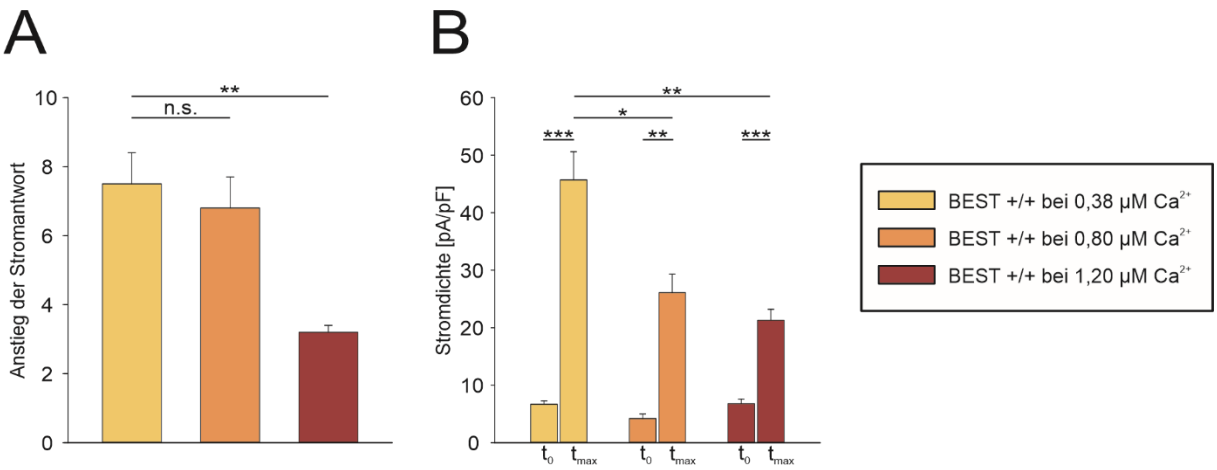


Abbildung 11: Stromanstieg und Stromdichte von hiPSC-RPE BEST +/+ bei 0,38 bis 1,2 µM Ca^{2+}

Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen einer Datenreihe (n≥6) mit SEM als Balkendiagramm. Unterschiede innerhalb der einzelnen Zelllinien wurden mithilfe eines zweiseitig ungepaarten T-Tests überprüft, bei dem Vergleich der verschiedenen Zelllinien wurde der Post hoc Dunn´s Test zur Korrektur für multiples Testen verwendet. Signifikanzen wurden akzeptiert bei p≤0,05 (*), p≤0,01 (**), p≤0,001 (***). **(A)** Die Balken zeigen jeweils den Anstieg der Stromantwort im Messverlauf errechnet durch Division der Strommenge zum Zeitpunkt t_{max} gegen die Strommenge zum Zeitpunkt t_0 für drei verschiedene Calciumkonzentrationen (0,38, 0,8 und 1,2 µM Ca^{2+}) bei 120 mV. **(B)** Die Balken zeigen jeweils die Strommenge bezogen auf die Größe der vermessenen Zelle zum Anfangszeitpunkt t_0 (jeweils links) und Endzeitpunkt t_{max} (jeweils rechts) für drei verschiedene Calciumkonzentrationen (0,38, 0,8 und 1,2 µM Ca^{2+}).

3.3.4 Stromprofil von hiPSC-RPE bei 24°C und 0,38 µM Ca^{2+}

Da bei unterschiedlichen Temperaturen zum Teil andere Effekte einer Proteinaktivität auftreten (Lin et al. 2019), wurden die hiPSC-RPE Zelllinien auch bei 24 °C mit 0,38 µM Ca^{2+} in der Intrazellulärlösung ein weiteres Mal unabhängig vermessen. Ergebnisse dieser Auswertung sind in **Abbildung 12** zusammengefasst. In allen drei Zelllinien (hiPSC-RPE BEST +/+, LRRC8A -/- und BEST -/-) ist erneut ein Anstieg der Stromantwort zu erkennen. HiPSC-RPE BEST +/+ Zellen (schwarzer Balken) erreichten dabei ebenso wie hiPSC-RPE BEST -/- Zellen in etwa das 6,6 (±1,0) -fache des Ausgangswerts. Der LRRC8A Knock-out erzielte nur Anstiege auf das 5,3 (±1,4) -fache. Hieraus ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied (p=0,364-0,603). Auf Seiten der Stromdichte ist erneut der für alle Zelllinien stark signifikante Anstieg des Gesamtstroms im Zeitverlauf ersichtlich. Unterschiede in der maximalen Aktivierungsstromstärke sind allerdings auch hier nicht zu erkennen. HiPSC-RPE

BEST +/+ Zellen erreichten ein Gesamtmaximum von 37,6 (±7,2) pA/pF, LRRC8A -/- einen Wert von 29,7 (±5,7) pA/pF und die BEST1 Knock-out Linie Stromhöhen im Bereich von 31,1 (±4,8) pA/pF. Trotz leichter Variabilität ist somit auch hier keine signifikante Unterscheidung möglich (p=0,930-1). Insgesamt waren somit nur leichte Verringerungen der Stromanstiege und Stromdichten der Kontrolllinien bei 24 °C gegenüber der physiologischen Temperatur von 37 °C festzustellen.

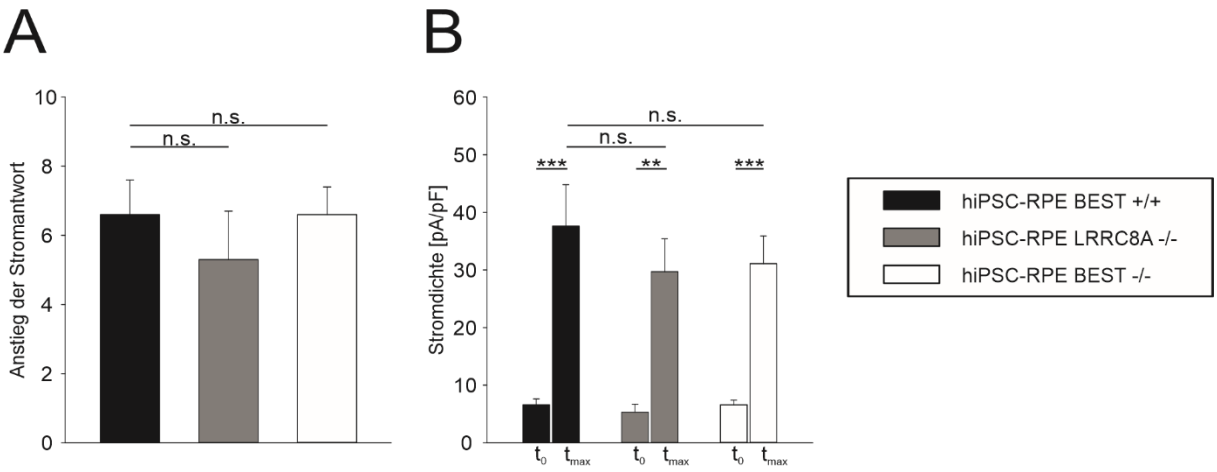


Abbildung 12: Stromanstieg und Stromdichte von hiPSC-RPE bei 120 mV und 24 °C

Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen einer Datenreihe (n≥7) mit SEM als Balkendiagramm. Unterschiede innerhalb der einzelnen Zelllinien wurden mithilfe eines zweiseitig ungepaarten T-Tests überprüft, bei dem Vergleich der verschiedenen Zelllinien wurde der Post hoc Dunn´s Test zur Korrektur für multiples Testen verwendet. Signifikanzen wurden akzeptiert bei p≤0,05 (*), p≤0,01 (**), p≤0,001 (***). **(A)** Die Balken zeigen jeweils den Anstieg der Stromantwort im Messverlauf errechnet durch Division der Strommenge zum Zeitpunkt t_{max} gegen die Strommenge zum Zeitpunkt t_0 für die drei verschiedenen Kontrollzelllinien hiPSC-RPE BEST +/+ (schwarz), hiPSC-RPE LRRC8A -/- (grau) und hiPSC-RPE BEST -/- (weiß). **(B)** Die Balken zeigen jeweils die Strommenge bezogen auf die Größe der vermessenen Zelle zum Anfangszeitpunkt t_0 (jeweils links) und Endzeitpunkt t_{max} (jeweils rechts) für die drei Kontrollzelllinien bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 24 °C und einer Klemmspannung von 120 mV.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den drei ausgetesteten Bedingungen keine Unterschiede in den einzelnen Zellsystemen zu erkennen waren. Somit sind die durchgeführten Messungen nicht geeignet, um eine Wirksamkeit der Wirkstoffderivate zu testen.

3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen im Überexpressionssystem

In weiteren Testreihen sollten nun zum einen die Intrazellulärlösungen mit den verschiedenen Ca^{2+}-Konzentrationen in anderen Zellsystemen getestet und zum anderen die BEST1-Kanäle im Überexpressionssystem vermessen werden, da dort generierte Stromantworten der Zellen sicher auf diesen Kanal zurückzuführen sind. Zweierlei Zelllinien wurden eingesetzt. Zunächst das klassische weitverbreitete System der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK), welches weltweit in elektrophysiologischen Experimenten verwendet wird (Okada 2012) und auch bei Untersuchungen an BEST1 bereits in vielen Studien genutzt wurde (Sun et al. 2002; Fischmeister und Hartzell 2005; Uggenti et al. 2016). Überexprimiertes BEST1 bleibt in HEK293T Zellen allerdings zum Großteil intrazellulär, wodurch die Aussagekraft über die Ionenleitfähigkeit der Membran hinterfragt werden muss (Fischmeister und Hartzell 2005). Zudem wurde ein experimenteller Ansatz mit humanen Retinoblastomzellen (Y79) gewählt. Diese Zelllinie war ebenfalls am Institut verfügbar und weist grundsätzlich gute elektrophysiologische Eigenschaften auf.

3.4.1 Kapazität von HEK293T und Y79 Zellen

Auch von HEK293T und Y79 Zellen wurde die Zellgröße indirekt über deren Kapazitäten bestimmt. Da die Größe der Membran grundsätzlich mit der Menge an dort lokalisiertem Protein zusammenhängt, ist auch die Strommenge, die produziert werden kann, von der Fläche der Plasmamembran abhängig. In **Abbildung 13** ist zu sehen, dass HEK293T Zellen eine ähnliche mittlere Kapazität aufweisen wie hiPSC-RPE Zellen. Sie erreichen Werte von 14,7 (±1,5) pF und sind damit nur leicht größer als Zellen des retinalen Pigmentepithels. Y79 Zellen sind im Gegensatz dazu mit einem Mittel von 5,98 (±0,3) pF deutlich kleiner.

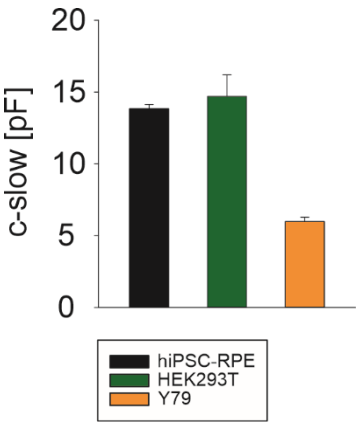


Abbildung 13: Kapazität von hiPSC-RPE, HEK293T und Y79 im Vergleich

Aufgezeigt sind die Mittelwerte aller Messungen der jeweiligen Datenreihen (n≥15) mit SEM als Balkendiagramm. Pro Balken ist der jeweilige mittlere c-slow Wert der einzelnen Zelllinien dargestellt, welcher als indirektes Maß für die Größe einer Zelle gilt.

3.4.2 Elektrophysiologie an HEK293T und Y79 Zellen

Zur Überprüfung der verwendeten Lösungen im HEK293T-System wurden zunächst grundsätzlich die gleichen Bedingungen verwendet, wie in den zuvor untersuchten hiPSC-RPE Zellen. Zusätzlich zu der intrazellulären Lösung mit 0,38 µM Ca^{2+} wurde allerdings auch eine Lösung mit 2,4 µM Ca^{2+} getestet. Eine derartige Erhöhung führte hier allerdings im Gegensatz zu den hiPSC-RPE Zellen nicht zu einer Steigerung des seriellen Widerstands. Bei stabil bleibenden R_s-Werten konnte somit von einer guten Validität der gemessenen Stromhöhen ausgegangen werden. In nicht-transfizierten HEK293T Zellen zeigte sich dadurch ein basaler Anstieg auf das 2,3 (±0,2) -fache der initial gemessenen Stromhöhen für niedrige sowie eine Erhöhung um das 2,0 (±0,4) -fache für hohe Ca^{2+}-Konzentrationen (siehe **Abbildung 14**). Diese geringen Anstiege können am ehesten als Hintergrundaktivierung angesehen werden. Zudem unterschieden sie sich nicht in Bezug auf ihren Wert, wodurch im weiteren Verlauf die Messungen der Negativkontrollen nicht gesondert nach Höhe der Ca^{2+}-Konzentration getrennt wurden, da stärkere zellspezifische Hintergrundeffekte durch eine Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration ausgeschlossen werden konnten.

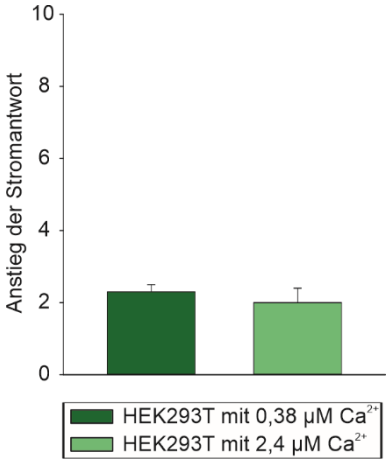


Abbildung 14: Stromanstieg in nicht-transfizierten HEK293T Zellen bei 120 mV

Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen einer Datenreihe (n≥10) mit SEM als Balkendiagramm. Signifikanzen wurden mittels eines zweiseitig ungepaarten T-Tests ermittelt und akzeptiert bei p≤0,05 (*), p≤0,01 (**), p≤0,001 (***). Die Balken zeigen jeweils den Anstieg der Stromantwort im Messverlauf errechnet durch Division der Strommenge zum Zeitpunkt t_{max} gegen die Strommenge zum Zeitpunkt t_0 für zwei verschiedene Calciumkonzentrationen (0,38 und 2,4 µM Ca2+)

Auch untransfizierte Y79 Zellen wurden verwendet, um die Funktionalität des Setups und der verwendeten Lösungen in einem zweiten Zellsystem zu überprüfen. Vereinzelt auf Concanavalin A ausgesäte Y79 Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen vermessen wie die hiPSC-RPE Zellen und die HEK293T Zellen zuvor. Dabei wurden die Ca^{2+}-Konzentrationen bei 0,38 µM und 2,4 µM eingestellt. In diesem Zellsystem blieb der serielle Widerstand dabei bei hohen Ca^{2+}-Konzentrationen ebenfalls konstant und stieg nicht über den kritischen Wert des Vierfachen des ursprünglichen Pipettenwiderstands an. Membranverschließende Effekte konnten somit auch hier nicht beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich bei den Y79 Zellen allerdings eine stärkere Hintergrundaktivierung bei hohen Ca^{2+}-Konzentrationen. Wie **Abbildung 15** zu entnehmen ist, steigt die Höhe der Stromantwort von einem 1,2 (±0,1) -fachen auf einen 1,9 (±0,2) -fachen Wert bei Verwendung von 2,4 µM Ca^{2+} in der Intrazellulärlösung. Dies stellt damit einen signifikanten Unterschied dar (p=0,016). Im Bereich der Stromdichte konnte bei niedriger Ca^{2+}-Konzentration dafür keine Aktivierung im Zeitverlauf beobachtet werden. Eine derartige Konzentration schien also nicht auszureichen um signifikante Effekte zu erzielen. Ein minimaler Anstieg auf ein Mittel von 10,3 (±0,7) pA/pF konnte zwar beobachtet werden, unterschied sich damit aber nicht wesentlich von den Ausgangsstromwerten. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei 2,4 µM Ca^{2+} in der Intrazellulärlösung eine leichte und signifikante Aktivierung des Stromflusses über die Zeit. Endwerte von 18,9 (±2,3) pA/pF wurden erreicht und unterschieden sich damit signifikant sowohl von den Ausgangsstromwerten dieser Messkondition (p=0,004) als auch von den Endwerten, welche bei der niedrigen Konzentration beobachtet werden konnten (p=0,006).

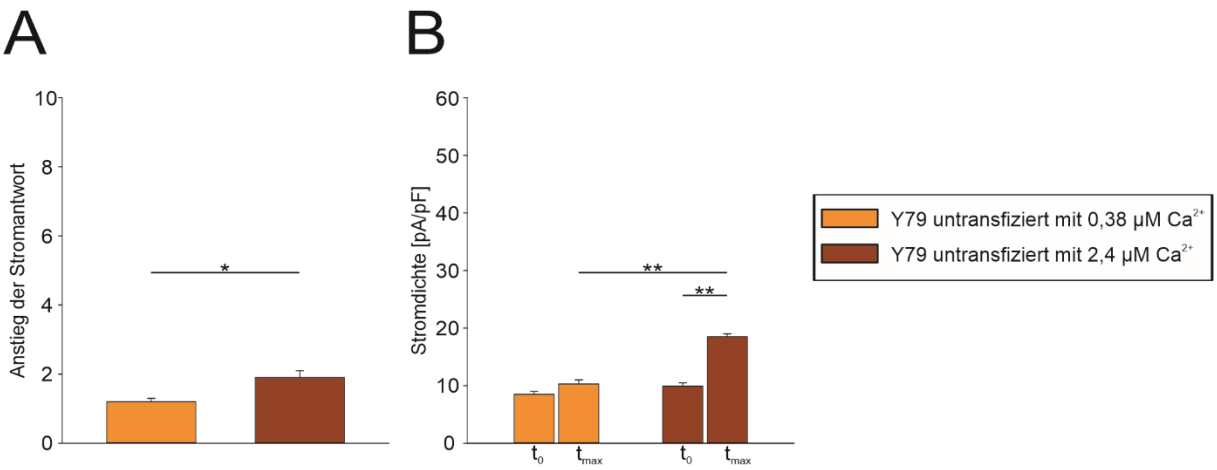


Abbildung 15: Stromanstieg und Stromdichte in Y79 Zellen bei 120 mV

Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen einer Datenreihe (n≥6) mit SEM als Balkendiagramm. Unterschiede innerhalb der einzelnen Bedingung sowie zwischen den zwei Modalitäten wurden mithilfe eines zweiseitig ungepaarten T-Tests überprüft. Signifikanzen wurden akzeptiert bei p≤0,05 (*), p≤0,01 (**), p≤0,001 (***). **(A)** Die Balken zeigen jeweils den Anstieg der Stromantwort im Messverlauf errechnet durch Division der Strommenge zum Zeitpunkt t_{max} gegen die Strommenge zum Zeitpunkt t_0 für zwei verschiedene Calciumkonzentrationen (0,38 und 2,4 µM Ca^{2+}) **(B)** Die Balken zeigen jeweils die Strommenge bezogen auf die Größe der vermessenen Zelle zum Anfangszeitpunkt t_0 (jeweils links) und Endzeitpunkt t_{max} (jeweils rechts) für 0,38 µM Ca^{2+} (links) und 2,4 µM Ca^{2+} (rechts) in der Intrazellulärlösung.

3.4.3 Aktivierung im Zeitverlauf in verschieden Zelllinien

Auch für HEK293T und Y79 Zellen können die Ströme im Zeitverlauf charakterisiert werden. In **Abbildung 16** sind im Vergleich beispielhafte Stromspuren von hiPSC-RPE BEST +/+ sowie jeweils eine Stromspur der beiden anderen Zelllinien dargestellt. Die mittlere Aktivierung im RPE-Zellsystem überstieg dabei deutlich die in HEK293T oder Y79 Zellen gemessenen Anstiege des Stromflusses. Auch hier wurde auf eine Konstanthaltung des Umkehrpotentials im Verlauf der Messung geachtet. Damit zeigt sich auch in dieser Darstellung im Einklang mit den zuvor beschriebenen Befunden, eine geringere Aktivierung in den Zellsystemen, die keine BEST1-Untereinheiten enthielten. Stromkurven der beiden getesteten Zelllinien blieben zumeist auch unterhalb des geringsten in hiPSC-RPE Zellen festgestellten Werts.

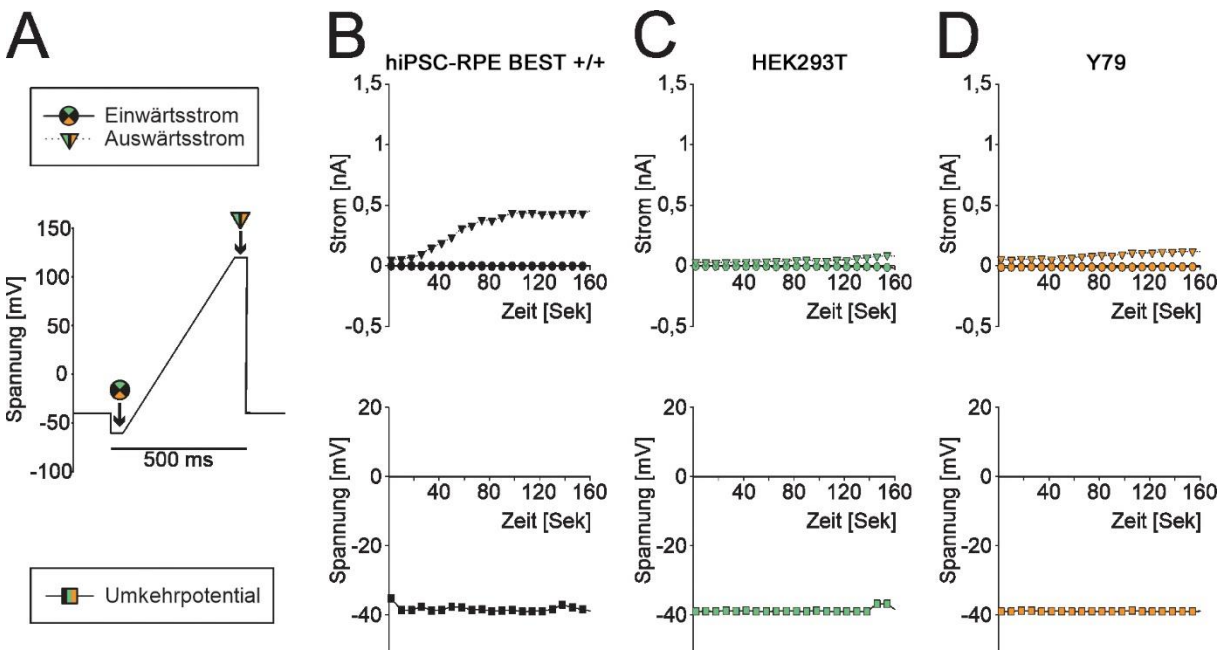


Abbildung 16: Beispielstromkurven von hiPSC-RPE BEST +/+, HEK293T und Y79 Zellen

(A) Legende und Schema des angelegten Spannungsprotokolls. Die Pfeile markieren die Entnahmezeitpunkte für die in Kurven (B)-(D) gezeigten Ströme. **(B)-(D)** Untereinander dargestellt sind jeweils eine beispielhafte Stromkurve sowie deren zugehöriges Umkehrpotential. **(B)** stellt dabei ein Beispiel für eine mittlere Aktivierung in hiPSC-RPE BEST +/+ dar **(C)** eine Beispielkurve für die Aktivierung in untransfizierten HEK293T Zellen und **(D)** die erreichbare Stromantwort in Y79.

Insgesamt lässt sich also sagen, dass sich die alternativ untersuchten Zellsysteme HEK293T und Y79 durchaus von den zuvor vermessenen hiPSC-RPE Zellen unterschieden. Zum Ersten zeigten HEK293T und Y79 Zellen keinen Anstieg des seriellen Widerstands, wodurch hier eine Verwendung einer höheren intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration möglich wäre, zum Zweiten waren resultierende Endstromhöhen und -dichten deutlich niedriger ausgeprägt als in dem endogen BEST1 exprimierenden System.

3.4.4 Transfektion von HEK293T und Y79 Zellen

Zum Einbringen von Kanalproteinen in die Zellsysteme wurden Transfektionen durchgeführt. Diese erfolgten bei HEK293T Zellen entweder mittels Lipofectamin®3000 nach Herstellerangaben oder mithilfe der Calcium-Phosphat-Methode. Unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA wurden verwendet (siehe **Tabelle 12**).

Jedes Protein war mit GFP fusioniert, sodass transfizierte Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop erkennbar waren. Zusätzlich erfolgte allerdings auch eine Co-Transfektion mit zusätzlichem GFP im Verhältnis 1:1, da somit das Fluoreszenzsignal stärker ausfiel und transfizierte Zellen bei den anschließenden elektrophysiologischen Untersuchungen leichter identifiziert werden konnten. Verwendet wurden drei verschiedene Proteine. Anoctamin-1 (ANO1), welches auch als TMEM16A bekannt ist, stellt einen bereits bei niedrigen Ca^{2+}-Konzentrationen aktiven Cl^--Kanal dar (Hartzell et al. 2009; Rock et al. 2009), der hier im Rahmen der nachfolgenden elektrophysiologischen Untersuchungen als starke Positivkontrolle dienen sollte. Außerdem erfolgten Transfektionen mit nativem BEST1 sowie der mutierten Untereinheit BEST1-R218C. Wie beispielhaft in **Abbildung 17** zu sehen ist, waren die Transfektionen erfolgreich. Die Co-Transfektion mit zusätzlichem GFP wies dabei ein stärkeres Fluoreszenzsignal auf.

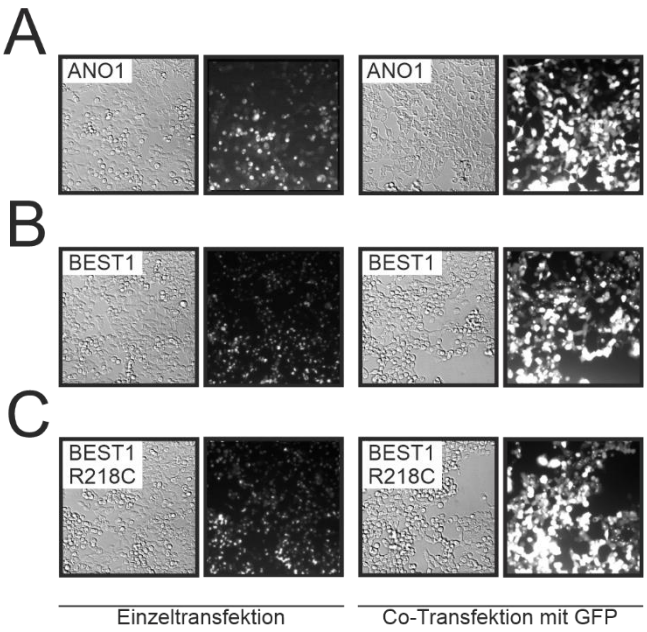


Abbildung 17: Transfektion von HEK293T Zellen

Die Aufnahmen zeigen licht- und fluoreszenzmikroskopische Kontrollen einer Transfektionsreihe mit jeweils 2-3 µg Plasmid-DNA. Die Expression der Kanalproteine kann dabei durch einen GFP-Tag mithilfe von Licht der Wellenlänge 574 nm detektiert werden (linke Spalte). Eine stärkere Signaldichte wird durch die Co-Transfektion mit GFP erreicht (rechte Spalte). **(A)** Transfektionen mit dem Kanalprotein ANO1 **(B)** Transfektionen des nativen BEST1 **(C)** Transfektionen des mutierten BEST1 R218C

Im Gegensatz zu HEK293T Zellen zeigten Vorexperimente am Institut, dass die Retinoblastomlinie Y79 eine schlechte Transfektionseffizienz besitzt. Zwei verschieden Methoden wurden dennoch untersucht. Ein Elektroporationsversuch schlug allerdings fehl. Auch 72 h nach elektroporativer Behandlung konnte im gesamten Transfektionsansatz kein Fluoreszenzsignal detektiert werden, welches den Erfolg der Behandlung angezeigt hätte. Im zweiten Ansatz wurde erneut Lipofectamin®3000 verwendet. Hierzu wurden die Zellen bereits im Vorfeld auf

Concanavalin A beschichteten Deckgläschen ausgesät, sodass die Behandlung bereits auf diejenigen Zellen konzentriert werden konnte, welche nachfolgend in den Patch-Experimenten verwendet werden sollten. 24-48 h nach Transfektion konnte hierbei tatsächlich vereinzelt ein Signal detektiert werden. Dieses beschränkte sich allerdings ebenfalls auf nur sehr wenige Zellen. Pro Deckgläschen konnten so zumeist nur ca. 2-3 Zellen detektiert werden, welche erfolgreich transfiziert waren. Durch die lange Inkubation der vereinzelten Zellen begannen diese allerdings auch wieder zu aggregieren und für Y79 Zellen typische Konglomerate zu bilden. Somit lagen einige dieser transfizierten Zellen in Gruppen vor und konnten ebenfalls nicht für die elektrophysiologische Untersuchung genutzt werden. Auf manchen verwendeten Deckgläschen konnte keine einzige transfizierte Zelle vermessen werden und der Versuch hieran zu arbeiten wurde aufgrund seiner zu geringen Effizienz wieder verworfen.

3.4.5 Elektrophysiologie an transfizierten HEK293T Zellen

Messungen an transfizierten HEK293T Zellen wurden in gleicher Weise wie an nicht-transfizierten HEK293T Zellen vorgenommen. Konsistent zum Fehlen eines Proteins, welches eine Chloridleitfähigkeit induziert, wurden sowohl in untransfizierten als auch GFP-exprimierenden Zellen ähnliche Ströme beobachtet. Der Stromanstieg betrug in beiden Systemen Werte um das 2,2-fache des Ausgangsstroms (**Abbildung 18A**). In der Stromdichte wurde eine signifikante Aktivierung über den Zeitverlauf festgestellt. Diese resultierte in nicht-transfizierten Zellen in einem Mittel von 11,5 (±3,4) pA/pF und schwankte in GFP-transfizierten Zellen um 10,3 (±1,5) pA/pF (siehe **Abbildung 18B**). Damit zeigten erwartungsgemäß diese beiden untersuchten Konditionen keine signifikanten Unterschiede. Zudem waren die gemessenen Stromhöhen weiterhin deutlich niedriger als die in hiPSC-RPE Zellen aufgezeichneten.

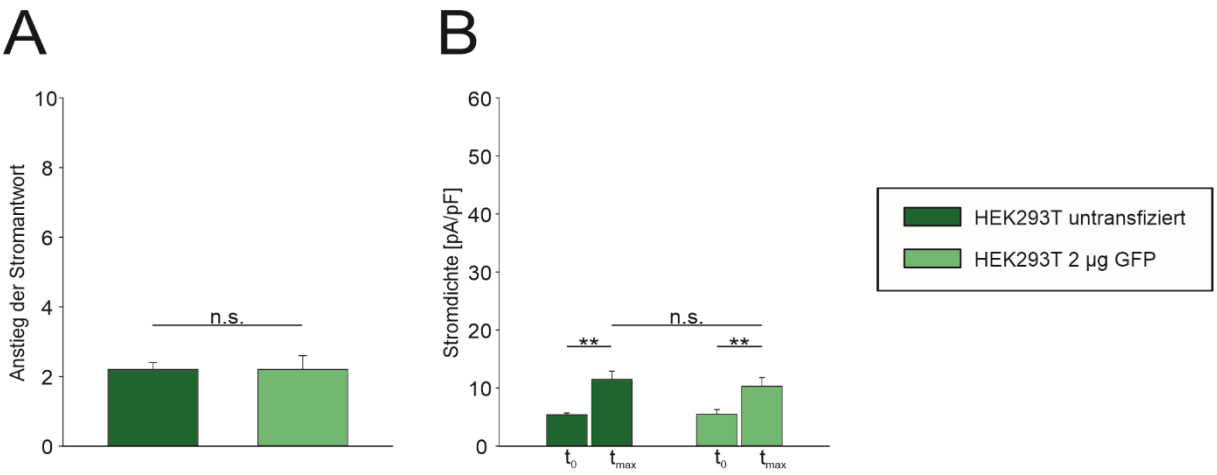


Abbildung 18: Stromanstieg und Stromdichte in HEK293T Zellen bei 120 mV

Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen einer Datenreihe (n≥10) mit SEM als Balkendiagramm, Signifikanzen wurden mittels eines zweiseitig ungepaarten T-Tests ermittelt und akzeptiert bei p≤0,05 (*), p≤0,01 (**), p≤0,001 (***). **(A)** Die Balken zeigen jeweils den Anstieg der Stromantwort im Messverlauf errechnet durch Division der Strommenge zum Zeitpunkt t_{max} gegen die Strommenge zum Zeitpunkt t_0 für nicht-transfizierte und 2 µg GFP transfizierte Zellen **(B)** Die Balken zeigen jeweils die Strommenge bezogen auf die Größe der vermessenen Zelle zum Anfangszeitpunkt t_0 (jeweils links) und Endzeitpunkt t_{max} (jeweils rechts) für untransfizierte (dunkelgrün) und mit 2 µg GFP transfizierte HEK293T Zellen (hellgrün).

Klare Aussagen über die physiologischen Eigenschaften der transfizierten Kanalproteine konnten jedoch nicht getroffen werden. Messungen waren nur erfolgreich an untransfizierten oder GFP-transfizierten Zellen durchführbar. Bei Verwendung der mit Kanalproteinen transfizierten HEK293T Zellen stellten sich qualitative Mängel ein, die auch durch vielfache Verbesserungsversuche mit unterschiedlichen Plasmid-DNA-Mengen, verschiedenen Transfektionsansätzen und unterschiedlichen HEK-Zelllinien nicht zu beseitigen waren. Es war daher nicht möglich Patch-Clamp Analysen dieser Systeme anzufertigen, was darauf hinweist, dass die Expression der Kanalproteine sich negativ auf die Vitalität der HEK293T Zellen auswirkte. Eine Verbesserung der Situation durch die getesteten Modifikationen der Transfektion konnte nicht erreicht werden.

3.5 Strom-/Spannungsdiagramme

Zum Ende jeder erfolgreichen Messreihe hin wurde zusätzlich eine Spannungstreppe von -60 bis +40 mV in Einzelschritten von 10 mV an alle vermessenen Zellen angelegt. Jeder Impuls dauerte dabei 50 ms (siehe **Abbildung 19A**). Die daraus resultierende Stromantwort konnte zu Beginn und Ende der jeweiligen Spannungspulse aufgenommen werden und die dabei entstandenen Kurven sind in **Abbildung 19B** und **C** zu sehen. Zu Beginn eines Spannungspulses zeigte sich mit zunehmender Klemmspannung eine größer werdende Differenz zwischen den vermessenen hiPSC-RPE Zelllinien und den anderen Zellsystemen (HEK293T und Y79). Alle Kurven schnitten dabei bei ca. -40 mV die X-Achse und zeigten somit auch hier noch einmal das durch die verwendeten Lösungen definierte Gleichgewichtspotential für Chloridströme, welches nahe am eingestellten Membranpotential der Zellen lag. Kurz nach Anlage einer neuen Klemmspannung fiel die Stromantwort aller Zellen allerdings ab. Gegen Ende der 50 ms war in allen untersuchten Zelllinien nur ein sehr geringer Stromfluss erkennbar, der mit einem nahezu vollkommenen Fehlen von Aktivität gleichgesetzt werden konnte. Hierbei ist keine Unterscheidung der verschiedenen Messsysteme möglich.

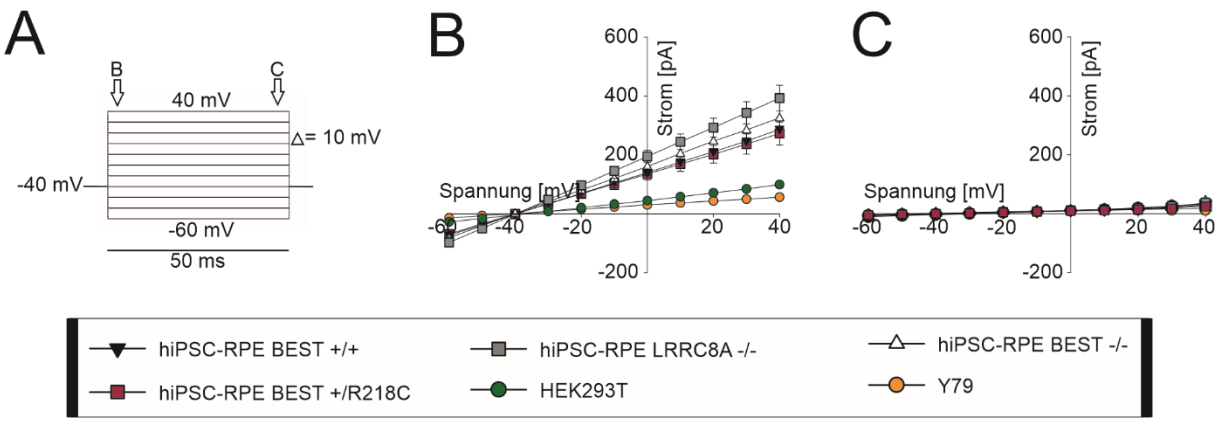


Abbildung 19: Strom-Spannungsdiagramme von hiPSC-RPE, HEK293T und Y79 Zellen

(A) Klemmprotokoll für Strom-Spannungsdiagramm, im Abstand von 50 ms werden Zellen von einem Ausgangswert von -40 mV heraus auf Spannungen von -60 bis +40 mV im Abstand von 10 mV geklemmt **(B) und (C)** Dargestellt ist der jeweilig gemessene Strom der Zellen bei Spannungen im Bereich von -60 bis +40 mV unmittelbar nach Anlegen der gewünschten Klemmspannung (B) sowie am Ende der Spannungsstufe (C). Einzelne Symbole stellen den Mittelwert aller validen Messungen mit Standardabweichung in beide Richtungen dar. Zu sehen sind Kurven für hiPSC-RPE BEST +/+ (schwarz), hiPSC-RPE BEST +/+ LRRC8 -/- (grau), hiPSC-RPE BEST -/- (weiß), hiPSC-RPE BEST +/R218C (rot) sowie für HEK293T (grün) und Y79 Zellen (orange).

Zusammenfassend lässt sich für die gemessenen Strom-Spannungskurven sagen, dass am Beginn eines Spannungspulses erneut ein Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien, nicht jedoch zwischen den verschiedenen hiPSC-RPE Zellen festgestellt werden konnte. Am Ende eines Spannungsplateaus war zudem auch keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zellsystemen möglich.

4. Diskussion

Mutationen in BEST1 führen zu distinkten Bildern von Netzhauterkrankungen. Neben der autosomal-dominanten Best´schen vitelliformen Makuladegeneration (Petrukhin et al. 1998; Marquardt et al. 1998), die mit Abstand am häufigsten unter den BEST1-assoziierten Erkrankungen auftritt, gibt es noch die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (Burgess et al. 2008) und die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie (Kaufman et al. 1982). Die unterschiedlichen pathologischen Phänotypen können dabei auf unterschiedliche Mutationen bzw. Mutationsorte im Protein zurückgeführt werden. Insgesamt über 350 Mutationen im *hBEST1* sind bislang beschrieben. Die identifizierten Mutationen lassen sich in mehrere Klassen aufteilen, welche zu Defekten in der Proteinsynthese und Kanalfunktion führen oder die Proteinstruktur verändern, was sich letztendlich in einer reduzierten Proteinstabilität zeigt (Nachtigal et al. 2020). Je nach Pathogenitätsursache sind entsprechend unterschiedliche Behandlungsoptionen zu diskutieren. Obwohl noch keine medikamentöse Therapie für die Bestrophinopathien zugelassen wurde, haben sich in den letzten Jahren vielversprechende Ansätze entwickelt. Diese zielen zum Teil spezifisch auf die krankheitsverursachenden Pathomechanismen ab (Uggenti et al. 2016; Liu et al. 2020). Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Proteinlokalisation bzw. Kanalfunktion in diesem Bereich könnte die Behandlung mit biologisch aktiven Substanzen, sogenannten Korrektoren bzw. Potentiatoren, darstellen. Dieser medikamentöse Ansatz repräsentiert eine Therapie, wie sie bereits bei der zystischen Fibrose erfolgreich zum Einsatz kommt (Hoy 2019). In einem Hochdurchsatz-Screening am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg wurde eine vielversprechende Potentiator-Wirkstoffgruppe entdeckt, welche auf ihre Verbesserung der Kanalfunktionalität mittels elektrophysiologischer Untersuchungen hin geprüft werden sollte. Hierfür wurden Zellmodelle verwendet, die endogen normales oder mutantes BEST1 exprimieren und aus Hautbiopsien gesunder und erkrankter Spender entstammen. Mittels induzierter pluripotenter Stammzelltechnologie wurden die gewonnenen Fibroblastenzellen reprogrammiert und anschließend in retinale Pigmentepithelzellen differenziert (Brandl et al. 2014; Kittredge et al. 2021).

4.1 Untersuchungen an hiPSC-RPE Zellen

Zur Typisierung der Chloridkanalleitfähigkeit wurden drei Kontroll- und eine Patienten-abgeleitete Zelllinie vermessen. Positivkontrollen stellten dabei die beiden wildtypisches BEST1 exprimierenden hiPSC-RPE Zelllinien (hiPSC-RPE BEST +/+ und hiPSC-RPE LRRC8A -/-) dar. Die eine Zelllinie repräsentierte dabei ein möglichst authentisches System, in dem alle relevanten Ionenkanäle des RPE in ihrer Funktionalität erhalten waren, in der anderen wurde zuvor mittels einer CRISPR/Cas9 Editierung die Expression des volumensensitiven Chloridkanals LRRC8A (Voss et al. 2014) ausgeschaltet. So sollten durch diese zweite Positivkontrolle Nebeneffekte des LRRC8A-Kanals ausgeschlossen werden. Als Negativkontrolle wurde eine zweite Knock-out Linie verwendet, die ebenfalls mithilfe von CRISPR/Cas9 generiert wurde und sich durch ein Fehlen der BEST1-Expression auszeichnete. Den eigentlichen Untersuchungsgegenstand stellte eine Zelllinie dar, welche eine BVMD-verursachende Mutation (BEST1-R218C) in heterozygotem Zustand enthielt. Kanäle, welche Untereinheiten dieses mutierten BEST1 beinhalten, sind zwar an der Plasmamembran der RPE-Zellen lokalisiert (Dürr 2020), weisen dort allerdings eine geringere Leitfähigkeit auf und stellen somit ein ideales Kriterium für die Überprüfung der Wirksamkeit eines Potentiator-Medikaments dar (Johnson et al. 2014; Dürr 2020; Nachtigal 2021). Die Proteinexpression und Lokalisation wurde jeweils mittels einer immunzytochemischen Färbung bei den verwendeten Linien überprüft und stellte sich konsistent zu den zu erwartenden Befunden dar. So konnte in den beiden Positivkontrollen sowie in der Patienten-abgeleiteten Zelllinie eine klare Expression und Lokalisation von BEST1 an der Membran nachgewiesen werden, wohingegen dieses Signal in hiPSC-RPE BEST -/- Zellen fehlte (vgl. **Abbildung 5B**).

4.1.1 Charakterisierung der Zellgröße mithilfe der Kapazität (c-slow Wert) der einzelnen hiPSC-RPE Linien

Mithilfe des c-slow Werts konnte zu Beginn jeder elektrophysiologischen Messung eine indirekte Aussage über die Größe einer Zelle getroffen werden. Je größer die Kapazität einer Zelle (repräsentiert durch den c-slow Wert) war, desto größer war auch deren Membranoberfläche. Für die verschiedenen hiPSC-RPE Linien zeigte sich dabei ein ihren Phänotypen entsprechendes Bild. Relativ zu den unbehandelten hiPSC-RPE BEST +/+ Zellen waren die beiden Knock-out Linien signifikant größer. Dabei erreichte

der LRRC8A Knock-out auch noch einmal ein größeres mittleres Volumen als der BEST1 Knock-out (vgl. **Abbildung 6**). Dies spricht für eine beeinträchtigte Volumenregulation in beiden Zelllinien und lässt sich gut mit der diskutierten Funktionalität der beiden Kanäle vereinbaren (Fischmeister und Hartzell 2005; Voss et al. 2014; Milenkovic et al. 2015; König und Stauber 2019). Bei beeinträchtigter Funktion eines volumensensitiven Kanals ist es sehr wahrscheinlich, dass die Regulation der Zellgröße erschwert ist (Lang et al. 1998). Genau diese Befunde zeigten sich hier im Rahmen der Experimente für die LRRC8A Knock-out Zellen mit der Konsequenz einer Zellschwellung. BEST1 wird ebenfalls eine Rolle im Volumenregulationsprozess der Zellen zugesprochen (Chien und Hartzell 2007; Stotz und Clapham 2012; Milenkovic et al. 2015) und genauso zeigte sich auch hier eine Erhöhung des Zellvolumens, auch wenn dieses nicht die Werte der LRRC8A Knock-out Linie erreichte. Dies spricht für eine geringfügig besser erhaltene Funktionalität, wenn die volumensensitiven LRRC8-Kanäle aktiv sind. Das System welches BEST1-R218C Untereinheiten enthielt, wies keine signifikanten Unterschiede zur BEST +/+ Kontrollzelllinie auf. Dies spricht am ehesten für eine weitgehendende Erhaltung der volumenregulatorischen Funktion durch die in der Plasmamembran lokalisierten Kanäle. Da die Charakterisierung über die Kapazität der Zellen allerdings nur ein indirektes Maß der Größe darstellt, weist dieser Wert keine sehr hohe Genauigkeit auf und kann durch leichte Variabilität am Setup beeinflusst werden (Okada 2012). Es kann daher sein, dass gering ausgeprägte Effekte nicht sichtbar werden, genauere Aussagen sollten also eher im Rahmen von Zellvolumenmessungen getroffen werden.

4.1.2 Whole-cell Messungen an hiPSC-RPE Zellen

Für die Aufzeichnung von Stromflüssen über die Zellmembran wurden hiPSC-RPE Zellen mithilfe von 500 ms langen Spannungsrampen, welche von -60 bis +120 mV reichten, vermessen. Dabei wurden die Zellen in isoosmotischer Badlösung inkubiert und mithilfe einer dem Intrazellulärraum ähnelnden Pipettenlösung aktiviert. In einem ersten Messdurchlauf wurden die Zelllinien bei einer konstanten Temperatur von 37 °C auf physiologischen Werten gehalten und die Induktion einer Ca^{2+}-abhängigen Cl^--Leitfähigkeit sollte mithilfe einer Ca^{2+}-Konzentration von 0,38 µM in der Intrazellulärlösung erfolgen. Dieser Wert liegt nahe an einer zuvor beschriebenen halbmaximalen Aktivierungsmenge von 0,45 µM Ca^{2+} und sollte somit eine moderate

Aktivierung erzielen (Li et al. 2017). Derartig vermessen wurden alle Kontrollsysteme sowie die Patienten-abgeleitete Linie hiPSC-RPE BEST +/R218C unter drei verschiedenen Bedingungen. DMSO-Zugabe wurde dabei als Negativkontrolle verwendet, da alle getesteten Wirkstoffe in DMSO gelöst waren. Außerdem wurden die beiden Wirkstoffderivate RT 001 und RT 053 eingesetzt. In einer Auswertung bezüglich des relativen Stromanstiegs über den Zeitverlauf hinweg sowie der Stromdichte zu Beginn und Ende einer Messkurve zeigten sich dabei im Mittel allerdings keine Unterschiede der einzelnen Bedingungen. Weder zwischen den Kontrollen noch zwischen den verschiedenen Wirkstoffbehandlungen konnte ein signifikanter Unterschied in der Stromantwort festgestellt werden (vgl. **Abbildung 7**). Dennoch zeigte sich in jeder Zelllinie eine grundsätzlich signifikante Reaktion im Zeitverlauf, sodass die gemessenen Stromspuren nach 2-3 min immer auf einem höheren Niveau zu liegen kamen. Ein Grund für die fehlende Unterscheidungsmöglichkeit lag in der großen Spannbreite der gemessenen Endstromhöhen und damit hohen Variabilität der Messwerte der einzelnen Zelllinien. So wurden in alle drei Kontrollen nicht nur sehr geringe Aktivierungsmuster, sondern auch sehr viel höhere Stromantworten aufgezeichnet (vgl. **Abbildung 8-10**). Diese Effekte könnten auf mehrerlei Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen sind die in diesen Experimenten gemessenen Endstromhöhen grundsätzlich auf einem sehr niedrigen Niveau. Eine Aktivität über 1 nA wurde nur in einer einzigen Messung beobachtet. Die mittleren Stromdichten stellten mit Werten um die 30-50 pA/pF bei 120 mV geringere Werte dar als von anderen Experimentatoren beschrieben. So zeigten frühere Studien beispielsweise für hiPSC-RPE Zellen gesunder Spender eine errechnete mittlere Stromdichte von ca. 80-120 pA/pF bei 100 mV nach Aktivierung mit 0,38 µM Ca^{2+} (Zhang et al. 2018; Li et al. 2017; Ji et al. 2019b; Zhao et al. 2021) Eine maximale Aktivierung der BEST1-vermittelten Stromantwort konnte ab einer Ca^{2+}-Konzentration von 1,2 µM mit ca. 350 pA/pF bei 100 mV beobachtet werden (Li et al. 2017; Zhao et al. 2021). Aufgrund der Vermutung, dass durch diese aktuell gegebenen Bedingungen nur eine sehr geringe Aktivierung erfolgte, wurde in einem nächsten Schritt die Ca^{2+}-Konzentration erhöht, welche für die Aktivierung der Chloridkanäle erforderlich ist. BEST1 exprimierende hiPSC-RPE Zellen wurden so zusätzlich mit 0,8 und 1,2 µM Ca^{2+} enthaltenden Pipettenlösungen vermessen. Anstatt einer stärkeren Aktivierung, die in einer höheren Stromantwort resultierte, reduzierten sich allerdings die gemessenen Stromkurven signifikant mit zunehmender Ca^{2+}-

Konzentration. Dieser Befund war eher überraschend und bedurfte einer näheren Betrachtung. Da diese Verringerung mit einer starken Erhöhung des seriellen Widerstands einherging, stellte das Phänomen sehr wahrscheinlich nicht die reellen Stromantworten der Zellen dar. Der Anstieg des Widerstands spiegelt zumeist einen Verschluss des Membranstücks unterhalb der Pipettenöffnung wider und bezeichnet somit am ehesten das Verlassen der Whole-cell Konfiguration mit einer partiellen Rückkehr zum On-cell Modus (Okada 2012). So können dann nur noch Ströme dieses kleinen Membranstücks aufgenommen werden, welche nicht mehr den Stromfluss über die gesamte Plasmamembran repräsentieren. Zur Beurteilung der Chloridleitfähigkeit der gesamten Zelle war diese Messreihe damit unbrauchbar. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zellen bei höherer Ca^{2+}-Konzentration eine stärkere Aktivierung gezeigt hätten, die allerdings nicht registriert werden konnte. Auch der Versuch diesen Effekt durch Erhöhung der EGTA-Konzentration in der Pipettenlösung abzuschwächen schlug fehl. Diese Problematik zeigte sich anscheinend in anderen einschlägigen Publikationen nicht. Patch-Clamp Untersuchungen an hiPSC-RPE Zellen mit Ca^{2+}-Konzentrationen zwischen 0 und 11 µM Ca^{2+} wurden hier vielfach beschrieben (Li et al. 2017; Almaça et al. 2009; Ji et al. 2019b; Sinha et al. 2020; Zhao et al. 2021).

Da eine niedrigschwellige Aktivierung bei niedrigen physiologischen Ca^{2+}-Konzentrationen durchaus vorhanden war, konnte nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die in der ersten Messreihe aufgenommenen Ströme durchaus von den BEST1-Kanälen stammten, allerdings noch ein weiterer Cl^--Kanal in diesem endogenen System eine Rolle spielte und die realen Stromspuren von BEST1 so zum Teil kaschiert wurden und damit schwer zuzuordnen waren. Neben dem volumensensitiven LRRC8A, dessen Beteiligung an unspezifischen Signalen durch die zweite Positivkontrolle bereits eliminiert werden konnte, wird in RPE-Zellen vor allem noch der TMEM16F/ Anoctamin-6 Chloridkanal exprimiert. Trotz noch immer intensiv diskutierter Relevanz wurde für dieses eigentlich als Scramblase aktive Protein (Yu et al. 2015) bei physiologischen Temperaturen eine Chloridkanalaktivität beschrieben (Lin et al. 2019; Schreiber et al. 2018). Diese konnte bei niedrigeren Temperaturen ab 27 °C nicht mehr nachgewiesen werden. Daher erfolgte in einem nächsten Schritt eine Reduktion der Umgebungstemperatur auf 24 °C. Mit diesen Bedingungen und erneut 0,38 µM Ca^{2+} in der Pipettenlösung wurden die drei Kontrolllinien hiPSC-RPE BEST +/+, LRRC8A -/- und BEST -/- noch einmal vermessen. Abgesehen von einer leichten

Reduktion der Endstromhöhen in allen drei Linien, die wohl am ehesten für eine größere Aktivität der Zellen bei physiologischen Temperaturen spricht, ließen sich auch hier keine Unterschiede zwischen den einzelnen Kontrolllinien ausmachen. Sowohl der Anstieg der Stromantwort als auch die Stromdichte zeigten für alle drei Bedingungen erneut vergleichbare Werte (vgl. **Abbildung 12**).

Eine Unterscheidung der verschiedenen hiPSC-RPE Linien war im Rahmen dieser Arbeit somit aufgrund der Gegebenheiten nicht möglich. Endogene Effekte durch die Grundeigenschaften der RPE-Zellen konnten hier nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine im Verlauf der Arbeit veröffentlichte Publikation von Zhao et al. 2021 konnte allerdings über Patch-Clamp Experimente in hiPSC-RPE Zellen zeigen, dass weitere Cl^--Kanäle in RPE-Zellen eigentlich nur eine sehr untergeordnete Rolle in der Cl^--Leitfähigkeit spielen. Der Knock-out von LRRC8A, TMEM16A und TMEM16B änderte hier nichts an den elektrophysiologischen Eigenschaften der hiPSC-RPE Zellen, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass adäquat gemessene Effekte in diesen Zellen durchaus auf BEST1 zurückzuführen sind. Zudem war es dort möglich durch den Knock-out von BEST1 Stromkurven in hiPSC-RPE Linien nahezu auszulöschen. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit eines solchen Nachweises im Rahmen dieses Projekts erfolgte dennoch im Anschluss der Wechsel in ein Überexpressionssystem, wo Nebeneffekte Großteils eliminiert werden sollten.

4.2 Untersuchungen an HEK293T und Y79 Zellen

4.2.1 Whole-cell Messungen an nicht-transfizierten Zellen

Zum Vergleich der zellulären Grundeigenschaften und der Reaktion der Messsysteme auf die verwendeten Lösungen wurden die Whole-cell Messungen an nicht-transfizierten HEK293T und Y79 Zellen durchgeführt. Dabei zeigten sich charakteristische Unterschiede in der Zellgröße und Stromantwort der verschiedenen Systeme. Während vereinzelte hiPSC-RPE und HEK293T Zellen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Zellgröße aufwiesen, war die durchschnittliche Zellgröße von Y79 Zellen auf einem deutlich niedrigeren Niveau (vgl. **Abbildung 13**). Dennoch zeigten HEK293T und Y79 Zellen untereinander vergleichbare Stromhöhen und -entwicklungen im Zeitverlauf. Wie in **Abbildung 16** gezeigt wird, konnten weder in HEK293T noch in Y79 Zellen vergleichbar hohe Stromantworten wie in hiPSC-RPE

Zellen, detektiert werden. Zwar stiegen auch hier die Stormkurven des Auswärtsstroms über die Zeit leicht an, erreichten dabei aber maximal eine Verdopplung des Ausgangswerts und stellten somit am ehesten eine leichte unspezifische Hintergrundaktivität dar. Bei guten Messparametern unter Verwendung von 0,38 µM Ca^{2+} in der Intrazellulärlösung wurden zudem Untersuchungen mit einer erhöhten Ca^{2+}-Konzentration von 2,4 µM durchgeführt, um die Reaktionen der Zellen darauf zu testen. In keiner der beiden Zelllinien konnte dabei ein Anstieg des seriellen Widerstands beobachtet werden. Auch mehrere Minuten nach Erreichen der Whole-cell Konfiguration zeigten sich stabile Werte, die nicht auf einen erneuten partiellen Verschluss der Plasmamembran durch Zellreparaturmechanismen oder eine anderweitige Verlegung der Pipettenöffnung durch Zellorganellen hindeuteten. Auch der Anstieg der Stromantwort veränderte sich in HEK293T Zellen dadurch nicht und in Y79 Zellen nur geringfügig. Damit präsentierten die jeweiligen Zelltypen klare Unterschiede zu den hiPSC-RPE Zellen, wodurch zwei der dort vorhandenen Probleme in diesen Systemen nicht auftauchten – die fehlende Toleranz gegenüber einer Ca^{2+}-Erhöhung sowie eine starke unspezifische Hintergrundaktivität, die keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Konditionen zuließ. Dies lässt noch einmal darauf schließen, dass die in den hiPSC-RPE Zellen beobachteten Effekte systemspezifisch waren und nicht durch die verwendeten Lösungen per se hervorgerufen wurden. Auch scheinen die dort gemessenen unspezifischen aber deutlichen Anstiege durchaus speziell mit diesen Zelllinien zusammenzuhängen, da in den zwei anderen Zellsystemen keine derartigen Effekte beobachtet werden konnten.

4.2.2 Generation von Überexpressionssystemen

Im Anschluss sollten nun die Stromprofile verschiedener BEST1-Untereinheiten im Fremdsystem analysiert werden. Zur Untersuchung der elektrophysiologischen Effekte von BEST1 in Überexpression wurden daher verschiedene Plasmide über transiente Transfektion in HEK293T Zellen eingebracht. Diese in der Elektrophysiologie mit am meisten genutzte Zellart stellt durch ihre geringe Expression an endogenen Kanälen ein ideales und leicht zu vermessendes Testsystem für zahlreiche Fragestellungen dar und wurde bereits in vielen Untersuchungen von BEST1 verwendet (Sun et al. 2002; Fischmeister und Hartzell 2005; Uggenti et al. 2016). Im Besonderen zeichnen sich HEK293T Zellen durch das Fehlen einer Ca^{2+}-aktivierten Cl^--Kanalaktivität aus (Li et

al. 2017). Konkret verwendet wurden hier drei verschiedene Proteine. Als starke Positivkontrolle sollte ein Expressionssystem mit TMEM16A/Anoctamin-1 dienen. Dieser ebenfalls Ca^{2+}-abhängige Cl^--Kanal reagiert bereits auf sehr geringe Mengen an intrazellulär vorhandenem Ca^{2+} und müsste daher bei 0,38 µM in der Pipettenlösung vollständig aktiviert werden können (Rock et al. 2009). Außerdem wurde eine Transfektion mit nicht-mutiertem BEST1 sowie ein Ansatz mit BEST1-R218C Mutationen durchgeführt. Alle Proteine waren dabei mit GFP markiert, sodass eine Identifikation transfizierter Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop möglich war. Aufgrund der relativ schwachen Intensität dieses Signals, wurden für Patch-Experimente verwendete Zellen zusätzlich mit GFP im Verhältnis 1:1 co-transfiziert. Bei allen Ansätzen konnte eine erfolgreiche Proteinexpression nachgewiesen werden (vgl. **Abbildung 17**).

Als zweites Überexpressionsmodell wurden Y79 Zellen ins Auge gefasst. Aus Vorexperimenten am Institut war allerdings bekannt, dass dieses Zellsystem eine schlechte Transfektionseffizienz aufweist. Dafür besitzen die Zellen ebenso wie HEK293T Zellen gute elektrophysiologische Eigenschaften und sind üblicherweise einfach zu vermessen. Daher wurden einige Transfektionsversuche gestartet. Ein Elektroporationsversuch schlug vollständig fehl. Auch 72 h nach der Stimulationsbehandlung konnte keine Expression der fluoreszierenden Proteine detektiert werden. Eine Transfektion mit Lipofectamin®3000 hingegen zeigte zumindest eine mäßige Effizienz. Transfizierte Einzelzellen waren aber auch hier nur wenige pro Ansatz vorhanden, sodass bei Inspektion in die Messkammer nur mehr 1-2 Zellen pro Deckgläschen überhaupt in geeigneter Form zu erkennen waren. Bei dieser geringen Dichte an verwertbaren Zellen wurden ursprüngliche Pläne zur Untersuchung von transfizieren Y79 Zellen verworfen und das Zellsystem lediglich zur Überprüfung der verwendeten Lösungen eingesetzt.

4.2.3 Whole-cell Messungen in transfizierten HEK293T Zellen

Trotz des klar ersichtlichen Fluoreszenzsignals, welches eine erfolgreich transfizierte HEK293T Zelle markierte, war es nicht möglich Stromkurven an Kanalprotein-exprimierenden Zellen abzuleiten. Auch die Nutzung nicht-transfizierter und mit 2 µg GFP transfizierter Zellen stellte sich als schwierig, aber zumindest nicht unmöglich dar.

Bei den meisten fluoreszierenden Zellen erschien die Plasmamembran instabil und konnte im Rahmen der Patch-Clamp Untersuchungen nicht mehr an den Rand der Glaspipette gesaugt werden, ohne dass sie einriss. Eine Untersuchung der transfizierten Zellen war so nicht möglich. Auch bei untransfizierten Zellen zeigte sich diese Instabilität zum Teil, dort war sie allerdings weniger konstant ausgeprägt.

Um die Ursachen dieser qualitativen Mängel zu ergründen, wurden einzelne Komponenten des Arbeitsprozesses an HEK293T Zellen Schritt für Schritt verändert. Die zur normalen Kultivierung der Zellen verwendeten Medien und Materialien wurden verworfen und neu angesetzt. Die Aussaat passagierter Zellen in 6-Well Platten als Vorbereitung zur Transfektion erfolgte zunächst mit Poly-L-Lysin Beschichtung. Um mögliche toxische Effekte dieser Substanz zu eliminieren, wurde im Verlauf der Experimente auf diese Beschichtung verzichtet. Nach initialer Verwendung der Calcium-Phosphat-Methode zur Transfektion der Zellen wurde auch eine alternative Behandlung mit Lipofectamin®3000 durchgeführt. Beide Transfektionsmethoden erzielten dabei eine sehr ähnliche Effizienz bei gleichbleibend schlechter Qualität der Zellen. Außerdem wurde eine schrittweise Reduktion der verwendeten Plasmidmenge von initial 3 µg auf bis zu 1 µg Gesamt-DNA versucht, wodurch die Expressionsmenge pro Zelle reduziert werden sollte. Dadurch wurde auf eine Verringerung des Zellstresses spekuliert, sodass sich eventuell die Plasmamembran stabilisieren würde. Die Aussaat auf Deckgläschen zur Patch-Vorbereitung erfolgte zunächst mithilfe einer Behandlung mit EDTA und Trypsin, um die Zellen vom Schalenboden abzulösen und zu vereinzeln. Nach Vermeidung der Poly-L-Lysin Beschichtung in den Transfektionswells wurde auch eine Versuchsreihe ohne diese Behandlung gestartet, um negative Effekte der Enzyme auf die Zellen vorzubeugen. Zudem erfolgte die erneute Aussaat auf Deckgläschen sowohl auf unbeschichtete, als auch auf Poly-L-Lysin- oder Fibronectin-behandelte Glasplättchen. Schließlich wurden im Rahmen der Whole-cell Messungen die verwendeten Bad- und Pipettenlösungen ausgetauscht, sodass ein negativer Effekt durch kontaminierte Lösungen ausgeschlossen werden konnte. Nichtsdestotrotz führte keiner dieser Ansätze zu einer merklichen Verbesserung der Zellqualität. Da auch unbehandelte Zellen oftmals schlecht zu untersuchen waren, wurde zudem ein PCR-Test auf eine Kontamination mit Mycoplasmen durchgeführt. Auch dieser verlief negativ. Außerdem wurden mehrmals frische HEK293T Zellen aufgetaut sowie eine alternative HEK-Zelllinie (HEK293-EBNA1) verwendet, um Probleme mit der Zelllinie an sich auszuschließen.

Nachdem keiner der oben spezifizierten Versuche zu einem Erfolg führte, wurde auch am Messplatz nach möglichen Ursachen gesucht. Zunächst erfolgte eine Überprüfung des Vor- und Hauptverstärkers, ob in der Messkammer generierte Signale richtig weitergegeben werden konnten. Diese Prüfung zeigte keinen Anhaltspunkt für Auffälligkeiten. Anschließend wurde das System, über welches Unterdruck an die untersuchten Zellen angelegt werden kann, kontrolliert. Schrittweise wurden Pipettenhalter und Unterdruckspritze ausgetauscht und somit auf deren Dichtigkeit überprüft. Der Austausch der Spritze führte tatsächlich zu einer zeitweise starken Verbesserung, wodurch diese zumindest als Teil des Problems verstanden werden konnte. Auch die Pipettenelektrode wurde getauscht, sodass mögliche abnutzungsbedingte Schwachstellen des Silberdrahts oder der Lötstelle eliminiert werden konnten. Zuletzt wurde noch das Heizfilament des DMZ-Zeitz-Pullers gewechselt. Hiermit wurde versucht negativen Auswirkungen einer schlecht gezogenen Pipettenspitzen entgegen zu wirken, auch wenn diese optisch keine Auffälligkeiten zeigten. Letztlich führte allerdings keiner dieser Verbesserungsversuche zu einem nachhaltigen Erfolg. Das Verhalten ist für HEK-Zelllinien, welche in der Regel gute bis sehr gute Seal-Eigenschaften ausbilden sehr untypisch. Es kann daher auch nicht ausgeschlossen werden, dass zwei oder mehrere Störfaktoren zur gleichen Zeit vorlagen und somit eine partielle Verbesserung eines Problems durch das Vorhandensein eines anderen Problems überdeckt wurde.

Dennoch war es trotz dieser großen technischen Schwierigkeiten zumindest teilweise möglich Messungen an HEK Zellen durchzuführen. Nicht-transfizierte und rein mit 2 µg GFP-transfizierte Zellen konnten in ausreichender Anzahl erfolgreich unter denselben Konditionen wie hiPSC-RPE Zellen vermessen werden. Auch nach Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration auf 2,4 µM stellten sich keine Probleme bezüglich der Widerstandserhöhungen ein. Außerdem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Konditionen, wodurch eine Beeinflussung der Zellen durch die Transfektion mit GFP ausgeschlossen werden konnte (vgl. **Abbildung 18**). Konkret zeigten die GFP-exprimierenden HEK293T Zellen eine schwache Aktivierung im Zeitverlauf auf in etwa eine Verdopplung des relativen Anstiegs der Stromantwort sowie ebenfalls leichte Effekte bei der Erhöhung der Stromdichte von ca. 5 auf 10 pA/pF. Aufgrund der geringen Hintergrundaktivität wäre das HEK-System daher durchaus geeignet, um expressionsinduzierte Ca^{2+}-abhängige Cl^--Ströme aufzuzeichnen. Wegen der zuvor bereits beschriebenen Qualitätsprobleme der Zellen

konnte jedoch keine konkrete Versuchsreihe mit den Kanalproteinen und den Wirkstoffderivaten durchgeführt werden. Die hier erhobenen Befunde sprechen am ehesten für eine Erhöhung des Zellstresses durch die Expression von Cl^--leitenden Kanalproteinen in HEK293T Zellen. Da allerdings in zahlreichen Publikationen erfolgreich an BEST1-exprimierenden HEK Zellen gepatcht wurde (Sun et al. 2002; Fischmeister und Hartzell 2005; Uggenti et al. 2016; Li et al. 2017; Ji et al. 2019b; Elverson et al. 2023b) und im aktuellen Experiment auch nicht-transfizierte Zellen nicht vollständig problemlos zu untersuchen waren, stellt diese Eigenschaft sicher nicht die einzige Hürde dar, die im Rahmen der Arbeit nicht überwunden werden konnte.

Eine weitere Herausforderung in Bezug auf die Untersuchung mit Wirkstoffderivaten in HEK293T Zellen würde sich vermutlich auch durch die Lokalisation der BEST1-Untereinheiten ergeben. In unpolaren HEK293T Zellen bleiben diese zumeist bereits in ihrer nativen Form intrazellulär und nur wenige Proteine erreichen die Plasmamembran (Fischmeister und Hartzell 2005). Selbst bei technisch einwandfrei funktionierendem Messaufbau könnte eine konkrete Aussage über die Verbesserung der Leitfähigkeit mutierter Kanaluntereinheiten ungewiss bleiben, da möglicherweise die Menge an beurteilbarem Protein zu gering wäre, um tatsächliche Effekte herausheben zu können. Andere Medikationsansätze, die z.B. auf die Verbesserung der Proteinfaltung und -lokalisation abzielen (wie beispielsweise bei Elverson et al.), würden hiervon vermutlich weniger gestört.

4.3 Strom-/Spannungsdiagramme

Im Anschluss an erfolgreich durchgeführte Whole-cell Messungen wurde in jedem Testsystem ein zusätzliches Klemmprotokoll angelegt. Hierbei wurden aus Spannungsstufen zwischen -60 und +40 mV Strom-/Spannungsdiagramme erstellt. Es wurde sowohl auf die initiale Stromantwort bei Anlegen einer neuen Spannungsstufe als auch auf die abschließende Stromantwort der Zellen nach ca. 50 ms am Ende einer Spannungsstufe geachtet (vgl. **Abbildung 19**). Danach ergaben sich zelllinienspezifische Unterschiede zwischen den hiPSC-RPE, HEK293T und Y79 Zellen, eine Unterscheidung zwischen einzelnen RPE Zelllinien konnte aber auch hier nicht gefunden werden. Zudem fiel die Stromantwort der Zellen zum Ende einer Spannungsstufe in jedem getesteten System so stark ab, dass keine Differenzen

zwischen den einzelnen Zellsystemen festgestellt werden konnten. Das einzige Unterscheidungsmerkmal stellte somit die Stromantwort der hiPSC-RPE Zellen dar, welche direkt nach Anlegen der Klemmspannung stark anstieg und dann exponentiell wieder abfiel. Dieser charakteristische Verlauf ist typisch für kapazitive Artefakte, welche beim Umladen einer Zellmembran auf die neu angelegte Spannung entstehen können. Normalerweise stellen kapazitive Artefakte bei c-slow Werten unterhalb von <20 pF allerdings kein Problem dar und können durch eine Kompensationskorrektur mithilfe des Programms umgangen werden (Okada 2012; Dallas und Bell 2021). Diese Mechanismen wurden hier durchaus auch angewandt. Ob die beobachteten Effekte kapazitativer Art waren oder eine klare Eigenschaft der hiPSC-RPE Zellen kann bei fehlender Vergleichbarkeit der einzelnen hiPSC-RPE Linien untereinander allerdings nicht eindeutig beurteilt werden. Derartige Effekte wurden in HEK293T und Y79 Zellen nur in einem sehr viel geringeren Ausmaß beobachtet.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Der BEST1-vermittelte Cl^--Transport im retinalen Pigmentepithel stellt eine wichtige Schlüsselfunktion zur Aufrechterhaltung der vielseitigen Aufgaben dieser Zellschicht dar. Bei Beeinträchtigung dieser Funktionen können je nach Mutationsmechanismus verschiedene Netzhauterkrankungen entstehen: die BVMD, ARB oder ADVIRC (Johnson et al. 2017). Für keine dieser Pathologien existiert bislang eine Therapieoption. Unabhängig von einer geringen Prävalenz dieser Erkrankungen, beispielsweise von etwa 1:25 000 in der Gesamtbevölkerung für BVMD (Bitner et al. 2012), wird in einigen Ansätzen intensiv an neuen Behandlungsgrundlagen geforscht. Neben der Gentherapie stehen auch einige vielversprechende Medikamentengruppen im Fokus der Experimente (Guziewicz et al. 2018; Tsai et al. 2018; Uggenti et al. 2016). Eine möglicherweise wirksame Potentiatorsubstanz wird aktuell am Institut für Humangenetik des Universität Regensburg getestet. In den im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Experimenten sollte die Verbesserung der Kanalleitfähigkeit von BEST1 durch Behandlung mit verschiedenen Derivaten des Grundwirkstoffs mittels Patch-Clamp Analysen verifiziert werden. Trotz technischer Durchführbarkeit an hiPSC-RPE Zellen zeigten sich in diesen Teilexperimenten keine Unterschiede der einzelnen Messbedingungen. Zudem war es nicht möglich hier zwischen den verwendeten Positiv- und Negativkontrollen zu unterscheiden. Ein Chloridstrom war in

allen Linien vorhanden. Mögliche weitere Analysen der hier aufgezeichneten Stromspuren könnten durch die Verwendung eines Chloridkanalblockers erfolgen. Zwar sind in den Knock-out Linien alle relevanten Chloridkanäle der RPE Zellen ausgeschaltet, eine spezifische Aussage über die Art der hier aufgezeichneten Ströme wäre somit dennoch eventuell besser möglich, da dann ein Cl^--spezifischer Strom in jedem Fall unterdrückt werden sollte.

Im Überexpressionssystem in HEK293T Zellen stellte sich ebenso wenig ein Erfolg ein, da hierbei trotz intensiver Verbesserungsversuche die Zellqualität nicht ausreichend aufrechterhalten werden konnte, um elektrophysiologische Experimente durchzuführen. Eine weitere Zelllinie (Y79 Zellen) konnte ebenfalls keine Verbesserung für das Überexpressionssystem bringen, sodass auch hier keine Untersuchung der nicht-mutanten und mutanten BEST1-Eigenschaften möglich war. Bei derartigen Problemen mit vorhandenen Zellsystemen könnte eventuell auch auf bereits erfolgreich in Bestrophinopathien erprobte andere Zelllinien ausgewichen werden. Diese wurden zwar bei weitem nicht so häufig verwendet wie HEK293T Zellen, wiesen aber in Expressionsstudien mit nachfolgender Patch-Clamp Analyse ebenfalls Ca^{2+}-abhängige Chloridströme auf. Hierzu gehören z.B. HeLa- oder ARPE-19-Zellen (Fischmeister und Hartzell 2005).

Abschließend lässt sich festhalten, dass zur Beurteilung von durch BEST1 verursachten Cl^--Leitfähigkeiten zunächst ein geeignetes und funktionierendes Überexpressionssystem gefunden werden muss. Grundsätzlich stellen HEK293T Zellen dabei das System der Wahl dar, allerdings muss in diesem Fall zunächst die Ursache der dort beobachteten Problematik gefunden und beseitigt werden. Erst wenn Ströme mit dem vorhandenen System charakterisiert werden können, macht es Sinn erneut Versuche in hiPSC-RPE Zellen zu starten und mit den in HEK293T oder einem anderen Zellsystem, erfolgreich getesteten Bedingungen die Versuchsreihe im endogenen System zu verifizieren. Um die Cl^--Leitfähigkeit in hiPSC-RPE Zellen bei höheren Ca^{2+}-Konzentrationen durchführen zu können, müssten möglicherweise die Kulturbedingungen geändert werden. Eventuell sind Medienzusätze wie z.B. Nicotinamid störend und daher ursächlich für die beobachteten Reaktionen der Zellmembran bei höheren Ca^{2+}-Konzentrationen. In Patch-Experimenten anderer Arbeitsgruppen unterschied sich die Zusammensetzung des Kulturmediums von hiPSC-RPE Zellen durchaus geringfügig von den hier verwendeten Substanzen. So

wurde bei Kittredge et al. 2018 beispielsweise kein Nicotinamid verwendet, dem Medium jedoch Hydrokortison und Triiodthyronin zugesetzt. Auch weitere Faktoren scheinen eine Rolle in der Zellqualität der hiPSC-RPE Zellen zu spielen. So erhöhte sich beispielsweise die Expressionsmenge von zellspezifischen Proteinen bei Tichotová et al. 2022 durch die Verwendung von nanofibrösen Biomembranen im Vergleich zu kommerziell erworbenen Polyester-Filtermembranen. Dörschmann et al. 2022 wiesen zudem eine höhere Expression von BEST1 bei Kultivierung mit Laminin als Coating-Substanz im Vergleich zu dem hier verwendeten Fibronectin nach. So zeigt sich, dass die Eigenschaften der hiPSC-RPE Zellen eine starke Abhängigkeit von ihren kulturellen Grundvoraussetzungen haben können und diese somit ausgiebig in Bezug auf das jeweilige Ziel des Experiments evaluiert werden sollten. Im Vorfeld zu weiteren Versuchsreihen sollte zudem eine ausgiebige Prüfung des Patch-Clamp Setups erfolgen. Dabei könnte es hilfreich sein, Zellen, falls möglich, auch an einem anderen Messplatz zu untersuchen, um so zwischen zellulären und technischen Problemen differenzieren zu können.

Abkürzungsverzeichnis

ADVIRC	Autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie
ANO1	Anoctamin-1
ARB	Autosomal-rezessive Bestrophinopathie
ATP	Adenosintriphosphat
AVMD	Altersbedingte vitelliforme Makuladegeneration
BEST1	Bestrophin-1
Br^-	Bromid
BVMD	Best´sche vitelliforme Makuladegeneration
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Cl^-	Chlorid
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/Cas9	Clustered regulary interspaced short palindromic repeats/ Cas9-Endonuclease
c-slow	Kapazitätswert Patch-Clamp
DAPI	4´,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco´s modified essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid/ Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco´s phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraacetat
EOG	Elektrooculogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
et al.	et alii/ und andere

F^-	Fluorid
FCS	Fetal Calf Serum/Fetales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Green fluorescent Protein/ Grünes fluoreszierendes Protein
GΩ	Gigaohm
h	Stunde
H_2O	Wasser
hBEST1	humanes *BEST1*-Gen
HBS	HEPES buffered saline
HCl	Salzsäure
HCO_3^-	Hydrogencarbonat
HEK293 EBNA1	Human embryonic kidney 293 Zellen Eppstein Barr Virus nukleäres Antigen1
HEK293T	Human embryonic kidney 293 Zellen Large-T-Antigen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hiPSC	human induced pluripotent stem cells/ humane induziert pluripotente Stammzellen
hiPSC-RPE	human induced pluripotent stem cells derived retinal pigment epithelium cells/ aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen entwickelte retinale Pigmentepithelzellen
I	Strom
I^-	Iodid
K^+	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LRRC8	Leucin-rich-region-containing Protein 8
M	Molar
max	Maximum
MDCKII	Madin Darby Canin Kidney II Zellen
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium

min	Minute/ Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
mosmol	Milliosmol
mRNA	messenger Ribonucleidacid/Messenger-Ribonucleinsäure
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
nA	Nanoampere
Na^+	Natrium
nm	Nanometer
OCT	Optical Coherence Tomography/Optische Kohärenz-tomographie
pA	Picoampere
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
pF	Picofarad
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
R_s	serieller Widerstand
RT 001	Wirkstoffderivat
RT 053	Wirkstoffderivat
SCN^-	Thiocyanat
Sek	Sekunde
SEM	standard error of the mean/ Standardfehler des Mittelwerts

t_0	Anfangszeitpunkt
t_{max}	Endzeitpunkt/ maximaler Zeitpunkt
TMEM16	Transmembrane Protein 16
vgl.	vergleiche
VRAC	Volume regulated anion channel/Volumenregulierter Anionenkanal
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
4-PBA	4-phenylbutyric acid/ Natrium-Phenylbutyrat

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau der Netzhaut	S. 11
Abbildung 2	Strukturmodell des Hühnchen-BEST1 nach Vaisey et al. 2016	S. 19
Abbildung 3	Stadien der BVMD	S. 23
Abbildung 4	Patch-Clamp Setup am Institut für Humangenetik	S. 43
Abbildung 5	Mikroskopie und immunzytochemische Färbung von hiPSC-RPE Zellen	S. 50
Abbildung 6	Kapazität von hiPSC-RPE Zellen	S. 52
Abbildung 7	Stromanstieg und Stromdichte von hiPSC-RPE bei 120 mV und 37 °C	S. 53
Abbildung 8	Beispielstromkurven von hiPSC-RPE BEST +/+	S. 54
Abbildung 9	Beispielstromkurven von hiPSC-RPE LRRC8A -/-	S. 55
Abbildung 10	Beispielstromkurven von hiPSC-RPE BEST -/-	S. 56
Abbildung 11	Stromanstieg und Stromdichte von hiPSC-RPE bei 0,38 bis 1,2 µM Ca^{2+}	S. 58
Abbildung 12	Stromanstieg und Stromdichte von hiPSC-RPE bei 120 mV und 24 °C	S. 59
Abbildung 13	Kapazität von hiPSC-RPE, HEK293T und Y79 im Vergleich	S. 61
Abbildung 14	Stromanstieg in nicht-transfizierten HEK293T Zellen bei 120 mV	S. 62
Abbildung 15	Stromanstieg und Stromdichte in Y79 Zellen bei 120 mV	S. 63
Abbildung 16	Beispielstromkurven von hiPSC-RPE BEST +/+, HEK293T und Y79 Zellen	S. 64
Abbildung 17	Transfektion von HEK293T Zellen	S. 65
Abbildung 18	Stromanstieg und Stromdichte in HEK293T Zellen bei 120 mV	S. 67
Abbildung 19	Strom-/Spannungsdiagramme von hiPSC-RPE, HEK293T und Y79 Zellen	S. 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mutationsklassen des *hBEST1*	S. 21
Tabelle 2	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	S. 28
Tabelle 3	Geräte und Materialien der Zellkultur	S. 28
Tabelle 4	In der Zellkultur verwendete Substanzen	S. 29
Tabelle 5	Zusammensetzung von hiPSC-RPE Medium (1% KOSR)	S. 30
Tabelle 6	Zusammensetzung von hiPSC-RPE Medium (5% KOSR)	S. 30
Tabelle 7	HEK293T Kulturmedium	S. 31
Tabelle 8	Y79 Kulturmedium	S. 31
Tabelle 9	Verwendete hiPSC-RPE Zelllinien	S. 32
Tabelle 10	Verwendete Substanzen und Kits im Rahmen von Transfektionen	S. 35
Tabelle 11	In transienter Transfektion verwendete Plasmide	S. 35
Tabelle 12	Eingesetze Plasmidmenge in verschiedenen Transfektionen	S. 36
Tabelle 13	Zusammensetzung des 2x HBS Puffers	S. 37
Tabelle 14	Transfektionsansatz der Calcium-Phosphat-Methode	S. 37
Tabelle 15	Zusammensetzung des Lipofectamin®3000 Transfektionsansatzes in HEK293T Zellen	S. 38
Tabelle 16	Zusammensetzung des Lipofectamin®3000 Transfektionsansatzes in Y79 Zellen	S. 39
Tabelle 17	Zusammensetzung des Elektroporationsansatzes	S. 39
Tabelle 18	Verwendete Materialien bei der Immunozytochemie	S. 41
Tabelle 19	Zusammensetzung der Lösungen für immunzytochemische Färbungen	S. 42
Tabelle 20	Geräte und Materialien des Patch-Clamp Setups	S. 44
Tabelle 21	Zusammensetzung der Extrazellulärlösung	S. 46
Tabelle 22	Zusammensetzung der Intrazellulärlösung	S. 46
Tabelle 23	Verschiedene Ca^{2+}-Konzentrationen in Intrazellulärlösung	S. 46

Literaturverzeichnis

Abascal, Federico; Zardoya, Rafael (2012): LRRC8 proteins share a common ancestor with pannexins, and may form hexameric channels involved in cell-cell communication. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 34 (7), S. 551–560. DOI: 10.1002/bies.201100173.

Allikmets, R.; Seddon, J. M.; Bernstein, P. S.; Hutchinson, A.; Atkinson, A.; Sharma, S. et al. (1999): Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies. In: *Human genetics* 104 (6), S. 449–453. DOI: 10.1007/s004390050986.

Almaça, Joana; Tian, Yuemin; Aldehni, Fadi; Ousingsawat, Jiraporn; Kongsuphol, Patthara; Rock, Jason R. et al. (2009): TMEM16 proteins produce volume-regulated chloride currents that are reduced in mice lacking TMEM16A. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (42), S. 28571–28578. DOI: 10.1074/jbc.M109.010074.

Altschwager, Pablo; Ambrosio, Lucia; Swanson, Emily A.; Moskowitz, Anne; Fulton, Anne B. (2017): Juvenile Macular Degenerations. In: *Seminars in pediatric neurology* 24 (2), S. 104–109. DOI: 10.1016/j.spen.2017.05.005.

Amato, Alessia; Wongchaisuwat, Nida; Lamborn, Andrew; Schmidt, Ryan; Everett, Lesley; Yang, Paul; Pennesi, Mark E. (2023): Gene therapy in bestrophinopathies: Insights from preclinical studies in preparation for clinical trials. In: *Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society* 37 (4), S. 287–295. DOI: 10.4103/sjopt.sjopt_175_23.

Barro-Soria, René; Aldehni, Fadi; Almaça, Joana; Witzgall, Ralph; Schreiber, Rainer; Kunzelmann, Karl (2010): ER-localized bestrophin 1 activates Ca2+-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 459 (3), S. 485–497. DOI: 10.1007/s00424-009-0745-0.

Bevers, Edouard M.; Williamson, Patrick L. (2010): Phospholipid scramblase: an update. In: *FEBS letters* 584 (13), S. 2724–2730. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.03.020.

Bianco, Lorenzo; Arrigo, Alessandro; Antropoli, Alessio; Berni, Alessandro; Saladino, Andrea; Vilela, Manuel Ap et al. (2024): Multimodal imaging in Best Vitelliform Macular Dystrophy: Literature review and novel insights. In: *European journal of ophthalmology* 34 (1), S. 39–51. DOI: 10.1177/11206721231166434.

Bitner, Hanna; Schatz, Patrik; Mizrahi-Meissonnier, Liliana; Sharon, Dror; Rosenberg, Thomas (2012): Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark. In: *American journal of ophthalmology* 154 (2), 403-412.e4. DOI: 10.1016/j.ajo.2012.02.036.

Boon, Camiel J. F.; Theelen, Thomas; Hoefsloot, Elisabeth H.; van Schooneveld, Mary J.; Keunen, Jan E. E.; Cremers, Frans P. M. et al. (2009): Clinical and molecular genetic analysis of best vitelliform macular dystrophy. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 29 (6), S. 835–847. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31819d4fda.

Brandl, Caroline; Zimmermann, Stephanie J.; Milenkovic, Vladimir M.; Rosendahl, Sibylle M. G.; Grassmann, Felix; Milenkovic, Andrea et al. (2014): In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). In: *Neuromolecular medicine* 16 (3), S. 551–564. DOI: 10.1007/s12017-014-8308-8.

Brunner, Janine D.; Schenck, Stephan; Dutzler, Raimund (2016): Structural basis for phospholipid scrambling in the TMEM16 family. In: *Current opinion in structural biology* 39, S. 61–70. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.05.020.

Buchholz, David E.; Pennington, Britney O.; Croze, Roxanne H.; Hinman, Cassidy R.; Coffey, Peter J.; Clegg, Dennis O. (2013): Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. In: *Stem cells translational medicine* 2 (5), S. 384–393. DOI: 10.5966/sctm.2012-0163.

Burgess, Rosemary; Millar, Ian D.; Leroy, Bart P.; Urquhart, Jill E.; Fearon, Ian M.; Baere, Elfrida de et al. (2008): Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. In: *American journal of human genetics* 82 (1), S. 19–31. DOI: 10.1016/j.ajhg.2007.08.004.

Centeio, Raquel; Ousingsawat, Jiraporn; Schreiber, Rainer; Kunzelmann, Karl (2020): Ca2+ Dependence of Volume-Regulated VRAC/LRRC8 and TMEM16A Cl- Channels. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 596879. DOI: 10.3389/fcell.2020.596879.

Chien, Li-Ting; Hartzell, H. Criss (2007): Drosophila bestrophin-1 chloride current is dually regulated by calcium and cell volume. In: *The Journal of general physiology* 130 (5), S. 513–524. DOI: 10.1085/jgp.200709795.

Cho, Hawon; Yang, Young Duk; Lee, Jesun; Lee, Byeongjoon; Kim, Tahnbee; Jang, Yongwoo et al. (2012): The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. In: *Nature neuroscience* 15 (7), S. 1015–1021. DOI: 10.1038/nn.3111.

Cordes, Magdalena; Bucichowski, Piotr; Alfaar, Ahmad S.; Tsang, Stephen H.; Almedawar, Seba; Reichhart, Nadine; Strauß, Olaf (2020): Inhibition of Ca(2+) channel surface expression by mutant bestrophin-1 in RPE cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (3), S. 4055–4071. DOI: 10.1096/fj.201901202RR.

Creel, Donnell J. (2019): The electrooculogram. In: *Handbook of clinical neurology* 160, S. 495–499. DOI: 10.1016/B978-0-444-64032-1.00033-3.

Dallas, Mark; Bell, Damian (2021): Patch Clamp Electrophysiology. New York, NY: Springer US (2188).

Davidson, Alice E.; Millar, Ian D.; Burgess-Mullan, Rosemary; Maher, Geoffrey J.; Urquhart, Jill E.; Brown, Peter D. et al. (2011): Functional characterization of bestrophin-1 missense mutations associated with autosomal recessive bestrophinopathy. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (6), S. 3730–3736. DOI: 10.1167/iovs.10-6707.

Davidson, Alice E.; Millar, Ian D.; Urquhart, Jill E.; Burgess-Mullan, Rosemary; Shweikh, Yusrah; Parry, Neil et al. (2009): Missense mutations in a retinal pigment

epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. In: *American journal of human genetics* 85 (5), S. 581–592. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.09.015.

Deneka, Dawid; Sawicka, Marta; Lam, Andy K. M.; Paulino, Cristina; Dutzler, Raimund (2018): Structure of a volume-regulated anion channel of the LRRC8 family. In: *Nature* 558 (7709), S. 254–259. DOI: 10.1038/s41586-018-0134-y.

Dörschmann, Philipp; Böser, Sebastian; Isik, David; Arndt, Christine; Roider, Johann; Selhuber-Unkel, Christine; Klettner, Alexa (2022): Influence of carrier materials and coatings on retinal pigment epithelium cultivation and functions. In: *Experimental eye research* 219, S. 109063. DOI: 10.1016/j.exer.2022.109063.

Duran, Charity; Thompson, Christopher H.; Xiao, Qinghuan; Hartzell, H. Criss (2010): Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable. In: *Annual review of physiology* 72, S. 95–121. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135811.

Dürr, Lisa Marie Johanna (2020): Entwicklung einer skalierbaren Wirkstoffscreening-Plattform zur Identifizierung therapeutisch einsetzbarer Modulatoren von mutantem Bestrophin-1. Dissertation. Universität Regensburg, Regensburg. Institut für Humangenetik.

Elverson, Kathleen; Freeman, Sally; Manson, Forbes; Warwicker, Jim (2023a): Computational Investigation of Mechanisms for pH Modulation of Human Chloride Channels. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 28 (15). DOI: 10.3390/molecules28155753.

Elverson, Kathleen; Warwicker, Jim; Freeman, Sally; Manson, Forbes (2023b): Tadalafil Rescues the p.M325T Mutant of Best1 Chloride Channel. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 28 (8). DOI: 10.3390/molecules28083317.

Fallah, Ghada; Römer, Thomas; Detro-Dassen, Silvia; Braam, Ursula; Markwardt, Fritz; Schmalzing, Günther (2011): TMEM16A(a)/anoctamin-1 shares a homodimeric architecture with CLC chloride channels. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10 (2), M110.004697. DOI: 10.1074/mcp.m110.004697.

Falzone, Maria E.; Malvezzi, Mattia; Lee, Byoung-Cheol; Accardi, Alessio (2018): Known structures and unknown mechanisms of TMEM16 scramblases and channels. In: *The Journal of general physiology* 150 (7), S. 933–947. DOI: 10.1085/jgp.201711957.

Fischmeister, Rodolphe; Hartzell, H. Criss (2005): Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels. In: *The Journal of physiology* 562 (Pt 2), S. 477–491. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.075622.

Fujii, Toshihiro; Sakata, Asuka; Nishimura, Satoshi; Eto, Koji; Nagata, Shigekazu (2015): TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (41), S. 12800–12805. DOI: 10.1073/pnas.1516594112.

Galietta, Luis J. V. (2009): The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels? In: *Biophysical journal* 97 (12), S. 3047–3053. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.09.024.

Grisanti, S. (1998): Das Immunprivileg des Auges. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 95 (2), S. 124–135. DOI: 10.1007/s003470050250.

Grubb, Søren; Poulsen, Kristian A.; Juul, Christian Ammitzbøll; Kyed, Tania; Klausen, Thomas K.; Larsen, Erik Hviid; Hoffmann, Else K. (2013): TMEM16F (Anoctamin 6), an anion channel of delayed Ca(2+) activation. In: *The Journal of general physiology* 141 (5), S. 585–600. DOI: 10.1085/jgp.201210861.

Guziewicz, Karina E.; Cideciyan, Artur V.; Beltran, William A.; Komáromy, András M.; Dufour, Valerie L.; Swider, Malgorzata et al. (2018): BEST1 gene therapy corrects a diffuse retina-wide microdetachment modulated by light exposure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (12), E2839-E2848. DOI: 10.1073/pnas.1720662115.

Guziewicz, Karina E.; Zangerl, Barbara; Lindauer, Sarah J.; Mullins, Robert F.; Sandmeyer, Lynne S.; Grahn, Bruce H. et al. (2007): Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 48 (5), S. 1959–1967. DOI: 10.1167/iovs.06-1374.

Gyobu, Sayuri; Ishihara, Kenji; Suzuki, Jun; Segawa, Katsumori; Nagata, Shigekazu (2017): Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (24), S. 6274–6279. DOI: 10.1073/pnas.1703391114.

Gyobu, Sayuri; Miyata, Haruhiko; Ikawa, Masahito; Yamazaki, Daiju; Takeshima, Hiroshi; Suzuki, Jun; Nagata, Shigekazu (2016): A Role of TMEM16E Carrying a Scrambling Domain in Sperm Motility. In: *Molecular and cellular biology* 36 (4), S. 645–659. DOI: 10.1128/MCB.00919-15.

Hartzell, Criss; Qu, Zhiqiang; Putzier, Ilva; Artinian, Liana; Chien, Li-Ting; Cui, Yuanyuan (2005): Looking chloride channels straight in the eye: bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 20, S. 292–302. DOI: 10.1152/physiol.00021.2005.

Hartzell, H. Criss; Qu, Zhiqiang; Yu, Kuai; Xiao, Qinghuan; Chien, Li-Ting (2008): Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. In: *Physiological reviews* 88 (2), S. 639–672. DOI: 10.1152/physrev.00022.2007.

Hartzell, H. Criss; Yu, Kuai; Xiao, Qinhuan; Chien, Li-Ting; Qu, Zhiqiang (2009): Anoctamin/TMEM16 family members are Ca2+-activated Cl- channels. In: *The Journal of physiology* 587 (Pt 10), S. 2127–2139. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.163709.

Hoy, Sheridan M. (2019): Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval. In: *Drugs* 79 (18), S. 2001–2007. DOI: 10.1007/s40265-019-01233-7.

Jentsch, Thomas J. (2016): VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (5), S. 293–307. DOI: 10.1038/nrm.2016.29.

Ji, Changyi; Kittredge, Alec; Hopiavuori, Austin; Ward, Nancy; Chen, Shoudeng; Fukuda, Yohta et al. (2019a): Dual Ca2+-dependent gates in human Bestrophin1

underlie disease-causing mechanisms of gain-of-function mutations. In: *Communications biology* 2, S. 240. DOI: 10.1038/s42003-019-0433-3.

Ji, Changyi; Li, Yao; Kittredge, Alec; Hopiavuori, Austin; Ward, Nancy; Yao, Peng et al. (2019b): Investigation and Restoration of BEST1 Activity in Patient-derived RPEs with Dominant Mutations. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 19026. DOI: 10.1038/s41598-019-54892-7.

Johnson, Adiv A.; Guziewicz, Karina E.; Lee, C. Justin; Kalathur, Ravi C.; Pulido, Jose S.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2017): Bestrophin 1 and retinal disease. In: *Progress in retinal and eye research* 58, S. 45–69. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.01.006.

Johnson, Adiv A.; Lee, Yong-Suk; Chadburn, Andrew J.; Tammaro, Paolo; Manson, Forbes D.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2014): Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1. In: *Experimental eye research* 121, S. 74–85. DOI: 10.1016/j.exer.2014.02.006.

Kane Dickson, Veronica; Pedi, Leanne; Long, Stephen B. (2014): Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel. In: *Nature* 516 (7530), S. 213–218. DOI: 10.1038/nature13913.

Kaufman, S. J.; Goldberg, M. F.; Orth, D. H.; Fishman, G. A.; Tessler, H.; Mizuno, K. (1982): Autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 100 (2), S. 272–278. DOI: 10.1001/archopht.1982.01030030274008.

Kefauver, Jennifer M.; Saotome, Kei; Dubin, Adrienne E.; Pallesen, Jesper; Cottrell, Christopher A.; Cahalan, Stuart M. et al. (2018): Structure of the human volume regulated anion channel. In: *eLife* 7. DOI: 10.7554/eLife.38461.

Kim, Kwon Woo; Hwang, Junmo; Kim, Dong-Hyun; Park, Hyungju; Lim, Hyun-Ho (2023): Cytosolic domain regulates the calcium sensitivity and surface expression of BEST1 channels in the HEK293 cells. In: *BMB reports* 56 (2), S. 172–177. DOI: 10.5483/bmbrep.2022-0170.

Kittredge, Alec; Ji, Changyi; Zhang, Yu; Yang, Tingting (2018): Differentiation, Maintenance, and Analysis of Human Retinal Pigment Epithelium Cells: A Disease-in-a-dish Model for BEST1 Mutations. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (138). DOI: 10.3791/57791.

Kittredge, Alec; Zhang, Yu; Yang, Tingting (2021): Evaluating BEST1 mutations in pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. In: Ion Channels: Channel Chemical Biology, Engineering, and Physiological Function, Bd. 654: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 365–382.

Kodigepalli, Karthik M.; Bowers, Kiah; Sharp, Arielle; Nanjundan, Meera (2015): Roles and regulation of phospholipid scramblases. In: *FEBS letters* 589 (1), S. 3–14. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.036.

König, Benjamin; Stauber, Tobias (2019): Biophysics and Structure-Function Relationships of LRRC8-Formed Volume-Regulated Anion Channels. In: *Biophysical journal* 116 (7), S. 1185–1193. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.02.014.

Krämer, F.; White, K.; Pauleikhoff, D.; Gehrig, A.; Passmore, L.; Rivera, A. et al. (2000): Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. In: *European journal of human genetics : EJHG* 8 (4), S. 286–292. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200447.

Kranjc, Agata; Grillo, Federico W.; Rievaj, Juraj; Boccaccio, Anna; Pietrucci, Fabio; Menini, Anna et al. (2009): Regulation of bestrophins by Ca2+: a theoretical and experimental study. In: *PloS one* 4 (3), e4672. DOI: 10.1371/journal.pone.0004672.

Lamb, Trevor D.; Collin, Shaun P.; Pugh, Edward N. (2007): Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. In: *Nature reviews. Neuroscience* 8 (12), S. 960–976. DOI: 10.1038/nrn2283.

Lang, F.; Busch, G. L.; Ritter, M.; Völkl, H.; Waldegger, S.; Gulbins, E.; Häussinger, D. (1998): Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. In: *Physiological reviews* 78 (1), S. 247–306. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.1.247.

Le, Trieu; Jia, Zhiguang; Le, Son C.; Zhang, Yang; Chen, Jianhan; Yang, Huanghe (2019): An inner activation gate controls TMEM16F phospholipid scrambling. In: *Nature communications* 10 (1), S. 1846. DOI: 10.1038/s41467-019-09778-7.

Lee, Byeongjun; Cho, Hawon; Jung, Jooyoung; Yang, Young Duk; Yang, Dong-Jin; Oh, Uhtaek (2014): Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. In: *Molecular pain* 10, S. 5. DOI: 10.1186/1744-8069-10-5.

Li, Ping; Hu, Meiqin; Wang, Ce; Feng, Xinghua; Zhao, ZhuangZhuang; Yang, Ying et al. (2020): LRRC8 family proteins within lysosomes regulate cellular osmoregulation and enhance cell survival to multiple physiological stresses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (46), S. 29155–29165. DOI: 10.1073/pnas.2016539117.

Li, Yao; Zhang, Yu; Xu, Yu; Kittredge, Alec; Ward, Nancy; Chen, Shoudeng et al. (2017): Patient-specific mutations impair BESTROPHIN1's essential role in mediating Ca2+-dependent Cl- currents in human RPE. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.29914.

Lin, Haiyue; Jun, Ikhyun; Woo, Joo Han; Lee, Min Goo; Kim, Sung Joon; Nam, Joo Hyun (2019): Temperature-dependent increase in the calcium sensitivity and acceleration of activation of ANO6 chloride channel variants. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 6706. DOI: 10.1038/s41598-019-43162-1.

Liu, Jingshu; Taylor, Rachel L.; Baines, Richard A.; Swanton, Lisa; Freeman, Sally; Corneo, Barbara et al. (2020): Small Molecules Restore Bestrophin 1 Expression and Function of Both Dominant and Recessive Bestrophinopathies in Patient-Derived Retinal Pigment Epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 61 (5), S. 28. DOI: 10.1167/iovs.61.5.28.

Liutkevičienė, Rasa; Lesauskaitė, Vaiva; Ašmonienė, Virginija; Gelžinis, Arvydas; Zaliūnienė, Dalia; Jašinskas, Vytautas (2012): Inherited macular dystrophies and differential diagnostics. In: *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 48 (9), S. 485–495.

Lorenz, B.; Preising, M. N. (2005): Morbus Best Ein Uberblick zur Pathologie und deren Ursachen. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 102 (2), S. 111–115. DOI: 10.1007/s00347-004-1158-2.

Manoury, Boris; Tamuleviciute, Aiste; Tammaro, Paolo (2010): TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells. In: *The Journal of physiology* 588 (Pt 13), S. 2305–2314. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.189506.

Marchant, D.; Yu, K.; Bigot, K.; Roche, O.; Germain, A.; Bonneau, D. et al. (2007): New VMD2 gene mutations identified in patients affected by Best vitelliform macular dystrophy. In: *Journal of medical genetics* 44 (3), e70. DOI: 10.1136/jmg.2006.044511.

Marmorstein, A. D.; Marmorstein, L. Y.; Rayborn, M.; Wang, X.; Hollyfield, J. G.; Petrukhin, K. (2000): Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23), S. 12758–12763. DOI: 10.1073/pnas.220402097.

Marmorstein, Alan D.; Cross, Harold E.; Peachey, Neal S. (2009): Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (3), S. 206–226. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.04.004.

Marmorstein, Alan D.; Kinnick, Tyson R. (2007): Focus on molecules: bestrophin (best-1). In: *Experimental eye research* 85 (4), S. 423–424. DOI: 10.1016/j.exer.2006.03.021.

Marmorstein, Alan D.; Kinnick, Tyson R.; Stanton, J. Brett; Johnson, Adiv A.; Lynch, Ronald M.; Marmorstein, Lihua Y. (2015): Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca2+ signaling in human retinal pigment epithelium. In: *Molecular vision* 21, S. 347–359.

Marquardt, A.; Stöhr, H.; Passmore, L. A.; Krämer, F.; Rivera, A.; Weber, B. H. (1998): Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). In: *Human molecular genetics* 7 (9), S. 1517–1525. DOI: 10.1093/hmg/7.9.1517.

Martins, Joana Raquel; Faria, Diana; Kongsuphol, Patthara; Reisch, Barbara; Schreiber, Rainer; Kunzelmann, Karl (2011): Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (44), S. 18168–18172. DOI: 10.1073/pnas.1108094108.

Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Milenkovic, Vladimir M.; Jendryke, Thomas; Sirianant, Lalida; Wanitchakool, Potchanart et al. (2015): Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (20), E2630-9. DOI: 10.1073/pnas.1418840112.

Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Nachtigal, Anna-Lena; Kellner, Ulrich; Weber, Bernhard H. F. (2020): Mutation-Dependent Mechanisms and Their Impact on Targeted Therapeutic Strategies with Reference to Bestrophin 1 and the Bestrophinopathies. In: *Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde* 237 (3), S. 259–266. DOI: 10.1055/a-1065-2129.

Milenkovic, Andrea; Milenkovic, Vladimir M.; Wetzel, Christian H.; Weber, Bernhard H. F. (2018): BEST1 protein stability and degradation pathways differ between autosomal

dominant Best disease and autosomal recessive bestrophinopathy accounting for the distinct retinal phenotypes. In: *Human molecular genetics* 27 (9), S. 1630–1641. DOI: 10.1093/hmg/ddy070.

Milenkovic, Andrea; Schmied, Denise; Tanimoto, Naoyuki; Seeliger, Mathias W.; Sparrow, Janet R.; Weber, Bernhard H. F. (2019): The Y227N mutation affects bestrophin-1 protein stability and impairs sperm function in a mouse model of Best vitelliform macular dystrophy. In: *Biology open* 8 (7). DOI: 10.1242/bio.041335.

Milenkovic, Vladimir M.; Brockmann, Marisa; Stöhr, Heidi; Weber, Bernhard Hf; Strauss, Olaf (2010): Evolution and functional divergence of the anoctamin family of membrane proteins. In: *BMC evolutionary biology* 10, S. 319. DOI: 10.1186/1471-2148-10-319.

Milenkovic, Vladimir M.; Krejcova, Sarka; Reichhart, Nadine; Wagner, Andrea; Strauss, Olaf (2011a): Interaction of bestrophin-1 and Ca2+ channel β-subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus. In: *PloS one* 6 (4), e19364. DOI: 10.1371/journal.pone.0019364.

Milenkovic, Vladimir M.; Langmann, Thomas; Schreiber, Rainer; Kunzelmann, Karl; Weber, Bernhard H. F. (2008): Molecular evolution and functional divergence of the bestrophin protein family. In: *BMC evolutionary biology* 8, S. 72. DOI: 10.1186/1471-2148-8-72.

Milenkovic, Vladimir M.; Rivera, Andrea; Horling, Franziska; Weber, Bernhard H. F. (2007): Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (2), S. 1313–1321. DOI: 10.1074/jbc.M607383200.

Milenkovic, Vladimir M.; Röhrl, Elena; Weber, Bernhard H. F.; Strauss, Olaf (2011b): Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 17), S. 2988–2996. DOI: 10.1242/jcs.085878.

Milenkovic, Vladimir M.; Soria, René Barro; Aldehni, Fadi; Schreiber, Rainer; Kunzelmann, Karl (2009): Functional assembly and purinergic activation of bestrophins. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 458 (2), S. 431–441. DOI: 10.1007/s00424-008-0626-y.

Miller, Alexandria N.; Vaisey, George; Long, Stephen B. (2018): Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin (58).

Molleman, Areles (2002): Patch Clamping. An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology. 1st ed. Chichester: John Wiley Sons Ltd. Online verfügbar unter http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0470856521.

Moshfegh, Yasmin; Velez, Gabriel; Li, Yao; Bassuk, Alexander G.; Mahajan, Vinit B.; Tsang, Stephen H. (2016): BESTROPHIN1 mutations cause defective chloride conductance in patient stem cell-derived RPE. In: *Human molecular genetics* 25 (13), S. 2672–2680. DOI: 10.1093/hmg/ddw126.

Nachtigal, Anna-Lena (2021): Untersuchungen zur molekularen Pathologie der Bestrophinopathien. Dissertation. Universität Regensburg, Regensburg. Institut für Humangenetik.

Nachtigal, Anna-Lena; Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Schulz, Heidi L.; Duerr, Lisa M. J.; Lang, Gabriele E. et al. (2020): Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. In: *International journal of molecular sciences* 21 (5). DOI: 10.3390/ijms21051597.

Neussert, Rudgar; Müller, Claudia; Milenkovic, Vladimir M.; Strauss, Olaf (2010): The presence of bestrophin-1 modulates the Ca2+ recruitment from Ca2+ stores in the ER. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460 (1), S. 163–175. DOI: 10.1007/s00424-010-0840-2.

Nilius, Bernd; Eggermont, Jan; Voets, Thomas; Buyse, Gunnar; Manolopoulos, Vangelis; Droogmans, Guy (1997): Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 68 (1), S. 69–119. DOI: 10.1016/s0079-6107(97)00021-7.

Nowomiejska, Katarzyna; Nasser, Fadi; Stingl, Katarina; Schimpf-Linzenbold, Simone; Biskup, Saskia; Brzozowska, Agnieszka et al. (2022): Disease expression caused by different variants in the BEST1 gene: genotype and phenotype findings in bestrophinopathies. In: *Acta Ophthalmologica* 100 (3), e847-e858. DOI: 10.1111/aos.14958.

Oh, Uhtaek; Jung, Jooyoung (2016): Cellular functions of TMEM16/anoctamin. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 468 (3), S. 443–453. DOI: 10.1007/s00424-016-1790-0.

Okada, Yasunobu (2012): Patch Clamp Techniques. Tokyo: Springer Japan.

Owji, Aaron P.; Wang, Jiali; Kittredge, Alec; Clark, Zada; Zhang, Yu; Hendrickson, Wayne A.; Yang, Tingting (2022): Structures and gating mechanisms of human bestrophin anion channels. In: *Nature communications* 13 (1), S. 3836. DOI: 10.1038/s41467-022-31437-7.

Pedemonte, Nicoletta; Galietta, Luis J. V. (2014): Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). In: *Physiological reviews* 94 (2), S. 419–459. DOI: 10.1152/physrev.00039.2011.

Pedersen, Stine F.; Okada, Yasunobu; Nilius, Bernd (2016): Biophysics and Physiology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Channel (VSOR). In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 468 (3), S. 371–383. DOI: 10.1007/s00424-015-1781-6.

Petrukhin, K.; Koisti, M. J.; Bakall, B.; Li, W.; Xie, G.; Marknell, T. et al. (1998): Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. In: *Nature genetics* 19 (3), S. 241–247. DOI: 10.1038/915.

Picollo, Alessandra; Malvezzi, Mattia; Accardi, Alessio (2015): TMEM16 Proteins: Unknown Structure and Confusing Functions. In: *Journal of Molecular Biology* 427 (1), S. 94–105. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.09.028.

Planells-Cases, Rosa; Jentsch, Thomas J. (2009): Chloride channelopathies. In: *Biochimica et biophysica acta* 1792 (3), S. 173–189. DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.02.002.

Qiu, Zhaozhu; Dubin, Adrienne E.; Mathur, Jayanti; Tu, Buu; Reddy, Kritika; Miraglia, Loren J. et al. (2014): SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. In: *Cell* 157 (2), S. 447–458. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.024.

Qu, Zhiqiang; Cheng, Wei; Cui, Yuanyuan; Zheng, Jie (2009): Human disease-causing mutations disrupt an N-C-terminal interaction and channel function of bestrophin 1. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (24), S. 16473–16481. DOI: 10.1074/jbc.M109.002246.

Radlovic, Nedeljko (2012): Cystic fibrosis. In: *Srp Arh Celok Lek* 140 (3-4), S. 244–249. DOI: 10.2298/SARH1204244R.

Reichhart, Nadine; Milenkovic, Vladimir M.; Halsband, Claire-Amelie; Cordeiro, Sönke; Strauss, Olaf (2010): Effect of bestrophin-1 on L-type Ca2+ channel activity depends on the Ca2+ channel beta-subunit. In: *Experimental eye research* 91 (5), S. 630–639. DOI: 10.1016/j.exer.2010.08.001.

Reichhart, Nadine; Strauss, Olaf (2014): Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium. In: *Experimental eye research* 126, S. 27–37. DOI: 10.1016/j.exer.2014.05.005.

Rock, Jason R.; O'Neal, Wanda K.; Gabriel, Sherif E.; Randell, Scott H.; Harfe, Brian D.; Boucher, Richard C.; Grubb, Barbara R. (2009): Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca2+-regulated Cl- secretory channel in mouse airways. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (22), S. 14875–14880. DOI: 10.1074/jbc.C109.000869.

Schreiber, Rainer; Ousingsawat, Jiraporn; Wanitchakool, Podchanart; Sirianant, Lalida; Benedetto, Roberta; Reiss, Karina; Kunzelmann, Karl (2018): Regulation of TMEM16A/ANO1 and TMEM16F/ANO6 ion currents and phospholipid scrambling by Ca2+ and plasma membrane lipid. In: *The Journal of physiology* 596 (2), S. 217–229. DOI: 10.1113/JP275175.

Schünke, Michael; Schulte, Erik; Schumacher, Udo (Hg.) (2015): Kopf, Hals und Neuroanatomie. Unter Mitarbeit von Markus Voll und Karl Wesker. Georg Thieme Verlag KG. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher ; Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker).

Shimizu, Takahiro; Iehara, Takahiro; Sato, Kaori; Fujii, Takuto; Sakai, Hideki; Okada, Yasunobu (2013): TMEM16F is a component of a Ca2+-activated Cl- channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl- channel. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 304 (8), C748-59. DOI: 10.1152/ajpcell.00228.2012.

Singh, Ruchira; Kuai, David; Guziewicz, Karina E.; Meyer, Jackelyn; Wilson, Molly; Lu, Jianfeng et al. (2015): Pharmacological Modulation of Photoreceptor Outer Segment Degradation in a Human iPS Cell Model of Inherited Macular Degeneration. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (11), S. 1700–1711. DOI: 10.1038/mt.2015.141.

Singh, Ruchira; Shen, Wei; Kuai, David; Martin, Jessica M.; Guo, Xiangrong; Smith, Molly A. et al. (2013): iPS cell modeling of Best disease: insights into the

pathophysiology of an inherited macular degeneration. In: *Human molecular genetics* 22 (3), S. 593–607. DOI: 10.1093/hmg/dds469.

Singh Grewal, Simranjeet; Smith, Joseph J.; Carr, Amanda-Jayne F. (2021): Bestrophinopathies: perspectives on clinical disease, Bestrophin-1 function and developing therapies. In: *Therapeutic advances in ophthalmology* 13, 2515841421997191. DOI: 10.1177/2515841421997191.

Sinha, Divya; Steyer, Benjamin; Shahi, Pawan K.; Mueller, Katherine P.; Valiauga, Rasa; Edwards, Kimberly L. et al. (2020): Human iPSC Modeling Reveals Mutation-Specific Responses to Gene Therapy in a Genotypically Diverse Dominant Maculopathy. In: *American journal of human genetics* 107 (2), S. 278–292. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.06.011.

Smith, Joseph J.; Nommiste, Britta; Carr, Amanda-Jayne F. (2019): Bestrophin1: A Gene that Causes Many Diseases. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1185, S. 419–423. DOI: 10.1007/978-3-030-27378-1_69.

Stotz, Stephanie C.; Clapham, David E. (2012): Anion-sensitive fluorophore identifies the Drosophila swell-activated chloride channel in a genome-wide RNA interference screen. In: *PloS one* 7 (10), e46865. DOI: 10.1371/journal.pone.0046865.

Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.

Sun, Hui; Tsunenari, Takashi; Yau, King-Wai; Nathans, Jeremy (2002): The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6), S. 4008–4013. DOI: 10.1073/pnas.052692999.

Suzuki, Jun; Fujii, Toshihiro; Imao, Takeshi; Ishihara, Kenji; Kuba, Hiroshi; Nagata, Shigekazu (2013): Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (19), S. 13305–13316. DOI: 10.1074/jbc.M113.457937.

Suzuki, Jun; Umeda, Masato; Sims, Peter J.; Nagata, Shigekazu (2010): Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. In: *Nature* 468 (7325), S. 834–838. DOI: 10.1038/nature09583.

Tichotová, Lucie; Studenovska, Hana; Petrovski, Goran; Popelka, Štěpán; Nemesh, Yaroslav; Sedláčková, Miroslava et al. (2022): Advantages of nanofibrous membranes for culturing of primary RPE cells compared to commercial scaffolds. In: *Acta Ophthalmologica* 100 (5). DOI: 10.1111/aos.15034.

Tien, Jason; Lee, Hye Young; Minor, Daniel L.; Jan, Yuh Nung; Jan, Lily Yeh (2013): Identification of a dimerization domain in the TMEM16A calcium-activated chloride channel (CaCC). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (16), S. 6352–6357. DOI: 10.1073/pnas.1303672110.

Tsai, Yi-Ting; Wu, Wen-Hsuan; Lee, Ting-Ting; Wu, Wei-Pu; Xu, Christine L.; Park, Karen S. et al. (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. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.04.001.

Uggenti, Carolina; Briant, Kit; Streit, Anne-Kathrin; Thomson, Steven; Koay, Yee Hui; Baines, Richard A. et al. (2016): Restoration of mutant bestrophin-1 expression, localisation and function in a polarised epithelial cell model. In: *Disease models & mechanisms* 9 (11), S. 1317–1328. DOI: 10.1242/dmm.024216.

Vaisey, George; Long, Stephen B. (2018): An allosteric mechanism of inactivation in the calcium-dependent chloride channel BEST1. In: *The Journal of general physiology* 150 (11), S. 1484–1497. DOI: 10.1085/jgp.201812190.

Vaisey, George; Miller, Alexandria N.; Long, Stephen B. (2016): Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the bestrophin ion channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (47), E7399-E7408. DOI: 10.1073/pnas.1614688113.

Voss, Felizia K.; Ullrich, Florian; Münch, Jonas; Lazarow, Katina; Lutter, Darius; Mah, Nancy et al. (2014): Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6184), S. 634–638. DOI: 10.1126/science.1252826.

Welsch, Ulrich; Deller, Thomas; Kummer, Wolfgang (Hg.) (2014): Lehrbuch Histologie. 4. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer.

Xiao, Qinghuan; Hartzell, H. Criss; Yu, Kuai (2010): Bestrophins and retinopathies. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460 (2), S. 559–569. DOI: 10.1007/s00424-010-0821-5.

Yang, Huanghe; Kim, Andrew; David, Tovo; Palmer, Daniel; Jin, Taihao; Tien, Jason et al. (2012): TMEM16F forms a Ca2+-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. In: *Cell* 151 (1), S. 111–122. DOI: 10.1016/j.cell.2012.07.036.

Yang, Tingting; Justus, Sally; Li, Yao; Tsang, Stephen H. (2015): BEST1: the Best Target for Gene and Cell Therapies. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (12), S. 1805–1809. DOI: 10.1038/mt.2015.177.

Yang, Tingting; Liu, Qun; Kloss, Brian; Bruni, Renato; Kalathur, Ravi C.; Guo, Youzhong et al. (2014): Structure and selectivity in bestrophin ion channels. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6207), S. 355–359. DOI: 10.1126/science.1259723.

Yang, Young Duk; Cho, Hawon; Koo, Jae Yeon; Tak, Min Ho; Cho, Yeongyo; Shim, Won-Sik et al. (2008): TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. In: *Nature* 455 (7217), S. 1210–1215. DOI: 10.1038/nature07313.

Yu, Kuai; Cui, Yuanyuan; Hartzell, H. Criss (2006): The bestrophin mutation A243V, linked to adult-onset vitelliform macular dystrophy, impairs its chloride channel function. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (11), S. 4956–4961. DOI: 10.1167/iovs.06-0524.

Yu, Kuai; Qu, Zhiqiang; Cui, Yuanyuan; Hartzell, H. Criss (2007): Chloride channel activity of bestrophin mutants associated with mild or late-onset macular degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 48 (10), S. 4694–4705. DOI: 10.1167/iovs.07-0301.

Yu, Kuai; Whitlock, Jarred M.; Lee, Kyleen; Ortlund, Eric A.; Cui, Yuan Yuan; Hartzell, H. Criss (2015): Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F. In: *eLife* 4, e06901. DOI: 10.7554/eLife.06901.

Yu, Kuai; Xiao, Qinghuan; Cui, Guiying; Lee, Amy; Hartzell, H. Criss (2008): The best disease-linked Cl- channel hBest1 regulates Ca V 1 (L-type) Ca2+ channels via src-homology-binding domains. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (22), S. 5660–5670. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0065-08.2008.

Zhang, Xiao-Hui; Tee, Louis Y.; Wang, Xiao-Gang; Huang, Qun-Shan; Yang, Shi-Hua (2015): Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 4, e264. DOI: 10.1038/mtna.2015.37.

Zhang, Yu; Kittredge, Alec; Ward, Nancy; Ji, Changyi; Chen, Shoudeng; Yang, Tingting (2018): ATP activates bestrophin ion channels through direct interaction. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3126. DOI: 10.1038/s41467-018-05616-4.

Zhao, Qingqing; Kong, Yang; Kittredge, Alec; Li, Yao; Shen, Yin; Zhang, Yu et al. (2021): Distinct expression requirements and rescue strategies for BEST1 loss- and gain-of-function mutations. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/elife.67622.

Zwaal, Robert F. A.; Comfurius, Paul; Bevers, Edouard M. (2004): Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. In: *Biochimica et biophysica acta* 1636 (2-3), S. 119–128. DOI: 10.1016/j.bbalip.2003.07.003.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Lisa Huttner, geboren am 10.12.1996, 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 Quellen gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____ _____

Lisa Huttner

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an dieser Stelle an Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber für die Ermöglichung der Durchführung meiner medizinischen Dissertation an der Universität Regensburg am Institut für Humangenetik und ganz besonders für das große Interesse, welches er meiner Arbeit entgegenbrachte sowie die daraus resultierende Unterstützung.

Des Weiteren geht mein besonderer Dank an Andrea Milekovic für die umfassende wissenschaftliche Betreuung im Rahmen des Forschungsvorhabens. Vielen Dank für das Erlernen neuer Methoden, die Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten, Ratschlägen zur technischen Auswertung und vielem mehr.

Ein weiterer großer Dank geht an Kerstin de Robles Maruri, die mir bei allen Labortätigkeiten mit Rat und Tat zur Seite stand und mit kontinuierlicher Unterstützung in nahezu allen Belangen stark zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Im Rahmen der Patch Clamp Untersuchungen bedanke ich mich sehr bei Prof. Dr. Christian Wetzel, der mich durch seine fachliche Expertise mehrmals unterstützt hat. Außerdem danke ich hier Verena Schmid und Martina Esser als „partners in crime“, die mit ihren offenen Ohren und zusätzlichem Sachverständnis eine große moralische Stütze für mich darstellten.

Nicht unerwähnt bleiben darf natürlich das restliche Team des Instituts, die einem durch eine herzliche Aufnahme in die Gemeinschaft sowie große und kleine Hilfestellungen stets ein wundervolles Arbeitsklima entgegenbrachten und somit auch maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich motiviert und unterstützt haben und in dieser Zeit auch das ein oder andere Mal auf mich verzichten mussten