

AUS DEM INSTITUT FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zu den Auswirkungen eines Bestrophin-1-Knockouts sowie einer
Wirkstoffbehandlung in hiPSC-RPE Zellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maxi Riesenbeck

2025

AUS DEM INSTITUT FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zu den Auswirkungen eines Bestrophin-1-Knockouts sowie einer
Wirkstoffbehandlung in hiPSC-RPE Zellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maxi Riesenbeck

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Flor
Tag der mündlichen Prüfung:	18.02.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bestrophin-1 (BEST1)	1
1.2 Bestrophinopathien	2
1.3 Einfluss von <i>BEST1</i> Mutationen auf zellphysiologische Prozesse	4
1.3.1 Einfluss von <i>BEST1</i> Mutationen auf die BEST1 Proteinstabilität	4
1.3.2 Einfluss von <i>BEST1</i> Mutationen auf die Phagozytose im RPE	4
1.3.3 Einfluss von <i>BEST1</i> Mutationen auf den lysosomalen pH-Wert im RPE.....	5
1.4 Zellmodelle zur Untersuchung von BEST1	5
1.5 Curcumin (CC) und Curcumin Light (CCL)	6
1.6 Ziel dieser Arbeit	8
2. Material	10
2.1 Chemikalien und Reagenzien	10
2.2 Antikörper	12
2.3 Lösungen	14
2.4 Zellkulturmaterialien	16
2.5 Kit- und Reaktionssysteme	17
2.6 Enzyme	17
2.7 Oligonukleotide und Sonden für quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)	18
2.8 hiPSC-RPE Zellen	19
2.9 Verbrauchsmaterialien	20
2.10 Geräte	21
2.11 Software	23
3. Methoden	24
3.1 Differenzierung und Kultivierung von hiPSC-RPE Zellen	24
3.2 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung (TEER)	24
3.3 Isolierung von Fotorezeptor-Außensegmenten (POS)	25
3.4 Langzeit POS-Zugabe	26
3.5 Analyse der POS-Degradation	26
3.6 Analyse des lysosomalen pH-Werts (pH _{Lys})	26
3.7 Wirkstoffbehandlung mit Curcumin Light (CCL)	27
3.8 Immunocytochemie (ICC)	28
3.9 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qRT-PCR	29

3.10 Gewinnung von Protein-Proben, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	30
3.11 Messung des lysosomalen pH-Werts (pH_{Lys})	32
3.12 Statistik.....	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Untersuchungen zu den Auswirkungen eines BEST1-Knockouts in hiPSC-RPE Zellen	34
4.1.1 Analyse der BEST1 Expression in den Knockout hiPSC-RPE Zelllinien... ..	34
4.1.2 Analyse der Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation nach Langzeit POS-Zugabe	35
4.1.2 Analyse von Drusen-, Seneszenz- und Stressmarkern nach Langzeit POS-Zugabe.....	39
4.1.3 Analyse der POS-Degradation.....	48
4.1.4 Analyse des lysosomalen pH-Wertes (pH_{Lys}).....	50
4.2 Untersuchungen zur Wirkstoffbehandlung mit Curcumin Light (CCL)	55
4.2.1 Effekt von CC und CCL auf die BEST1 Expression und Lokalisation in hiPSC-RPE Zellen	55
4.2.2 Analyse verschiedener M. Best und ARB Zelllinien	60
5. Diskussion	64
5.1 Auswirkungen von POS-Zugabe auf BEST1-KO hiPSC-RPE Zellen	64
5.2 Lysosomaler pH-Wert in BEST1-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen ...	67
5.3 CCL als Therapieoption.....	68
5.4 Fazit und Ausblick	70
7. Zusammenfassung	72
8. Literaturverzeichnis	74

1. Einleitung

1.1 Bestrophin-1 (BEST1)

Das Bestrophin-1 Protein (BEST1), kodiert durch das *BEST1* Gen, ist ein integrales Membranprotein, welches beim Menschen vorwiegend in der basolateralen Plasmamembran des retinalen Pigmentepithels (RPE) exprimiert wird (1, 2). *BEST1* und die drei paralogen Gene *BEST2*, *BEST3* und *BEST4* gehören zu einer evolutionär konservierten Familie (3). *BEST1* findet sich auf Chromosom 11q13 und hat eine genomische Ausdehnung von ca. 15 Kilobasen (4, 5). Das Gen ist in elf Exone unterteilt, von denen zehn für das BEST1 Protein mit 585 Aminosäuren und einem molekularen Gewicht von ca. 68 kDa (3) kodieren. Mehrere Forschungsgruppen konnten mithilfe von Röntgenstrukturanalysen und Kryo-Elektronenmikroskopie eine homopentamere Struktur von BEST1 nachweisen (6–9).

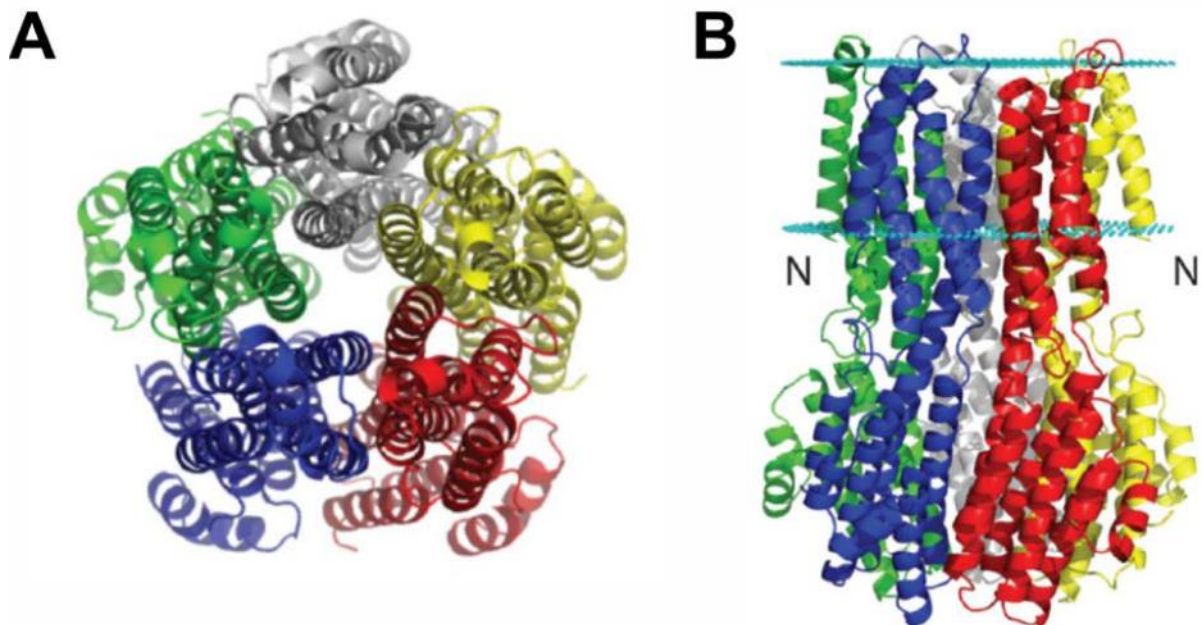


Abbildung 1: Kristallstruktur von BEST1.

Banddiagramm des Best1-Pentamers aus identischen BEST1-Untereinheiten (unterschiedlich eingefärbte Protomere), von der Außenseite der Membran (**A**) und von der Seite (**B**) betrachtet. Abbildung übernommen von Yang et al. (7).

Ausgiebige Untersuchungen zur Funktion von BEST1 zeigen, dass es als Kalzium-regulierter Chlorid-Kanal zur Funktion des RPE beiträgt (1, 10–13). Daneben gibt es Hinweise, dass weitere monovalente Ionen durch den BEST1-Kanal transportiert

werden können (9, 14, 15). Ebenso wird eine Rolle im volumenregulierten Anionen-Strom angenommen (2, 13). Darüber hinaus werden BEST1 weitere regulative Funktionen zugeschrieben (1, 13, 14, 16).

1.2 Bestrophinopathien

Mutationen im *BEST1* Gen können zu distinkten Makula-Erkrankungen führen, welche als Bestrophinopathien bezeichnet werden. Hierbei werden aktuell zwei autosomal-dominant vererbte Formen und eine autosomal-rezessive Form unterschieden: Morbus Best (M. Best) (4, 5), die autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) (17) und die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB) (18). Ebenfalls mit Mutationen im BEST1 Gen in Verbindung gebracht wurden das autosomal dominante Mikrokornea- Zapfen-Stäbchen-Dystrophie- Katarakt- posteriores-Staphylom- (MRCS-) Syndrom (19) sowie die autosomal dominante Retinitis Pigmentosa (RP) (20). Es wurden bereits über 300 krankheitsverursachende distinkte Mutationen im *BEST1* Gen beschrieben (21), bei denen es sich zu circa 90% um Missense-Mutationen handelt, die in der stark konservierten N-terminalen Hälfte des Proteins auftreten (22, 23). Klinisch präsentieren sich die Bestrophinopathien durch den progressiven zentralen Visusverlust, einen reduzierten bis erloschenen *light peak* im Elektrookulogramm sowie die zunehmende Akkumulation von Lipofuszin, welche in der Fundoskopie zu erkennen ist. In der Folge können chorioretinale Atrophie, Narbenbildung und Neovaskularisation auftreten. Die Bestrophinopathien zeigen eine hohe Varianz im Phänotyp, der Penetranz und der Expressivität (1, 13).

Die häufigste Form der Bestrophinopathien ist der M. Best, erstbeschrieben durch Friedrich Best 1905 (24). Der Erkrankungsbeginn liegt häufig in der zweiten bis vierten Lebensdekade, dies ist jedoch sehr variabel (13). Pathognomonisch sind zentrale gelblich-zystische (vitelliforme) Läsionen, die zur synonym verwendeten Bezeichnung Bestsche vitelliforme Makuladystrophie (*Best Vitelliform Macular Dystrophy*, BVMD) geführt haben (1, 13). Zur klinischen Klassifikation des Erkrankungsverlaufs kann die Einteilung von Mohler und Fine verwendet werden. Stadium 0 beschreibt ein subnormales EOG ohne Auffälligkeiten in der Fundoskopie. Im Stadium 1 (prävitelliformes Stadium) treten erste makulare Veränderungen auf. Stadium 2

(vitelliformes Stadium) zeigt die charakterischen Fundusläsionen, bestehend aus flüssigkeitsgefüllten Netzhautablösungen mit gelblich-autofluoreszenten Lipofuszin-enthaltenden Arealen. In Stadium 3 (pseudohypopyones Stadium) kommt es zum RPE-Zellverlust und zu beginnenden Visuseinschränkungen. Innerhalb der Läsionen wird ein Flüssigkeitsspiegel sichtbar. Stadium 4 beschreibt die fortschreitende Degeneration der Retina mit konsekutivem Visusverlust (1, 13, 25).

Die ADVIRC wurde 1982 von Kaufman et al. zum ersten Mal beschrieben (26) und tritt deutlich seltener auf (17, 18, 27). Typischerweise finden sich die retinalen Veränderungen eher peripher und es zeigt sich eine scharf demarkierte chorioretinale Atrophie vom Äquator bis zur Ora serrata. Häufig verläuft die Erkrankung langsam progredient und der Visus bleibt erhalten (17, 26).

2008 beschrieben Burgess et al. eine Netzhauterkrankung, der biallelische Mutationen in *BEST1* zugrunde liegen, die ARB. Hierbei können homozygote oder zusammengesetzt-heterozygote Konstellationen vorliegen. Der Erkrankungsbeginn der ARB liegt in der ersten oder zweiten Lebensdekade, deutlich früher als beim M. Best. Zudem treten die Lipofuszin-Ablagerungen eher diffus fleckförmig verteilt über die Retina auf. Koinzident wurden Hyperopie und Winkelblockglukome beschrieben. Heterozygote Familienmitglieder zeigen keine entsprechenden Pathologien (1, 13, 18).

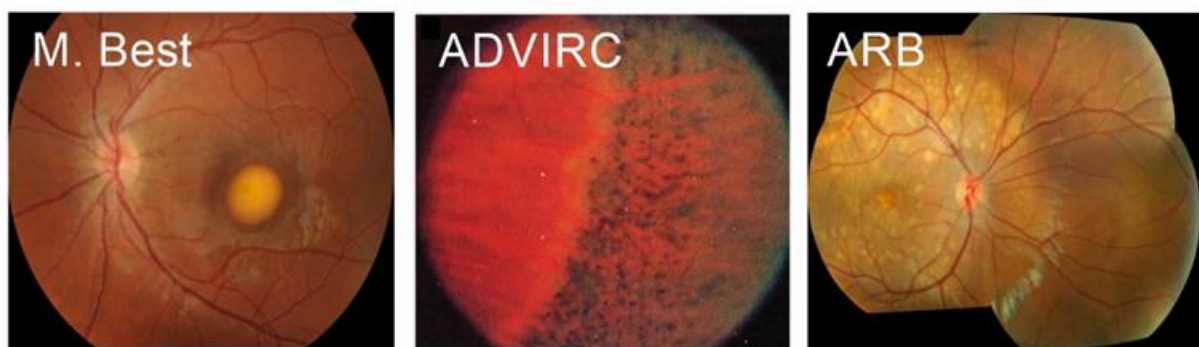


Abbildung 2: Charakteristische Fundusaufnahmen von M. Best, ADVIRC und ARB.

Erkennbar sind eine gelbliche, gut abgegrenzte Lipofuszinablagerung mittig der Makula (M. Best), eine scharf abgegrenzte hyperpigmentierte Demarkationslinie (ADVIRC), sowie kleine Läsionen und multiple gelbliche Ablagerungen entlang der Gefäßarkaden (ARB). Abbildung modifiziert nach Nachtigal et al. (M. Best und ARB) und Kellner et al. (ADVIRC) (28, 29).

Bis heute gibt es keine zugelassene Therapie für die Bestrophinopathien. Neben medikamentösen Ansätzen (30) sind auch Genersatztherapien Gegenstand der aktuellen Forschung (31).

1.3 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf zellphysiologische Prozesse

1.3.1 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die BEST1 Proteinstabilität

Um die Auswirkungen von *BEST1* Mutationen auf Proteinebene aufzuklären, wurden verschiedene mögliche Mechanismen untersucht. Während frühere Forschungen bereits eine gestörte Kanalfunktion (2, 14, 15, 28) sowie eine fehlerhafte Lokalisation (22, 32) beschrieben, zeigen neuere Arbeiten Hinweise auf eine Systematik in der Degradation von mutiertem BEST1. Es wurde beschrieben, dass bei der ARB vorliegende BEST1 Varianten bereits im endoplasmatischen Retikulum erkannt und proteasomal abgebaut werden. Bei den autosomal-dominanten Bestrophinopathien vorliegende Proteinvarianten schienen diesen Kontrollpunkt zu übergehen und erst im Golgi-Apparat oder an der Plasmamembran erkannt zu werden und somit einen endo-lysosomalen Abbauweg zu durchlaufen (28). Ein solcher Mechanismus könnte zum Krankheitsbild des M. Best und der ADVIRC beitragen. Jedoch zeigten sich auch in den Kontroll-Zelllinien Hinweise auf einen lysosomalen Umsatz von BEST1 (22, 28).

1.3.2 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf die Phagozytose im RPE

Wesentliche Aufgaben des RPE sind die Phagozytose und der Abbau von Photorezeptor-Außensegmenten (*photoreceptor outer segments*, POS). Jede RPE-Zelle kommt mit etwa 30-50 POS in Kontakt, von denen 10-15% pro Tag abgebaut und ersetzt werden. Als wichtige Faktoren für ein effektives Funktionieren dieses Systems werden ein ausgeglichener Elektrolyt- und Volumenhaushalt sowie eine optimale lysosomale Proteolyse angenommen. Bei Störungen, ob durch erhöhten oxidativen Stress, physiologische Alterungsprozesse oder retinale Erkrankungen, wird eine Akkumulation von Lipofuszin, einem gelblich-autofluoreszenten Abbauprodukt des Photopigments Rhodopsin mit toxischer Wirkung auf das RPE, diskutiert (33, 34). Dieser Mechanismus wird auch für die Pathophysiologie der Bestrophinopathien als relevant in Erwägung gezogen (1, 13, 34).

Experimente von Singh et al. zeigten, dass in M. Best-assoziierten RPE Zellkulturen ein verzögerter Abbau von Rhodopsin sowie eine Akkumulation von autofluoreszentem Material auftraten, was möglicherweise den funduskopisch sichtbaren Läsionen entspricht. Als Ursache wurden die durch *BEST1* Mutationen verursachten Störungen in der zellulären Homöostase diskutiert (16, 35).

1.3.3 Einfluss von *BEST1* Mutationen auf den lysosomalen pH-Wert im RPE

Wird mutiertes *BEST1* vermehrt lysosomal abgebaut, könnte eine daraus resultierende Überlastung der Lysosomen zu deren Funktionsstörung führen. Um die Funktionstüchtigkeit der Lysosomen zu beurteilen, kann der lysosomale pH-Wert (pH_{Lys}) herangezogen werden, da lysosomale Enzyme für ihre Aktivierung ein saures Milieu benötigen (36, 37). Auch im RPE wurde für den POS-Verdau ein lysosomaler Abbauweg beschrieben (33). Daher könnte ein erhöhter pH_{Lys} eine gestörte POS-Degradation zur Folge haben.

Ohne vorherige Konditionierung zeigte sich kein signifikanter Unterschied im pH_{Lys} zwischen M. Best und Kontroll-Zelllinien (28, 35). Nach zweiwöchiger Zugabe von POS zur Induktion von lysosomalem Stress konnte in der Arbeit von Nachtigal et al. jedoch ein Absinken des pH_{Lys} der Kontroll- und ARB Zelllinien ins saure Milieu beobachtet werden, was auf eine regelrechte Aktivierung der lysosomalen Enzyme auch bei ARB hinweist. Der pH_{Lys} der M. Best Zelllinien zeigte jedoch keine entsprechende Azidifizierung. Daraus wurde geschlossen, dass die gesteigerte Degradation von M. Best assoziiertem *BEST1*-Protein die lysosomale Homöostase beeinträchtigt (28).

1.4 Zellmodelle zur Untersuchung von *BEST1*

Zur Erforschung der zellphysiologischen Prozesse bei primären RPE-Pathologien wie M. Best, haben sich RPE aus human-induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-RPE) als besonders wertvolles, natives Modellsystem erwiesen (2, 16, 38). In der Analyse von Morphologie, Zellmarkern, Integrität und POS-Degradation wiesen sie vergleichbare physiologische Eigenschaften wie das native RPE auf (38). Da sie gezielt aus Zellen gesunder Spender:innen oder Patient:innen mit Bestrophinopathien

gewonnen werden können, exprimieren sie entsprechend endogen entweder in der gesunden Kontrolle homozygot die normale Form von BEST1, bei M. Best heterozygot die mutierte Form von BEST1 bzw. in ARB Zelllinien biallelisch mutiertes BEST1. Einige pathophysiologische Eigenschaften von BEST1 Mutationen konnten in hiPSC-RPE von Patient:innen gezeigt werden, während die von gesunden Spender:innen diese nicht aufwiesen (16).

Vergleichende Untersuchungen von M. Best und Kontroll-hiPSC-RPE Zelllinien unter Zugabe von physiologischen Stressoren zeigten in mehreren Studien eine erhöhte Autofluoreszenz, gesteigerten oxidativen Stress, Defizite im Flüssigkeitstransport, eine verzögerte Rhodopsin-Degradation sowie Störungen der Calcium-Homöostase, die unmittelbar mit der Pathophysiologie von M. Best in Verbindung gebracht werden können (16, 35).

Somit können hiPSC-RPE Zellmodelle zum weiteren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen von Bestrophinopathien beitragen. Des weiteren können mutationsspezifische Effekte aufgedeckt (28) und mögliche Therapieansätze Patient:innen-spezifisch in vitro erforscht werden.

1.5 Curcumin (CC) und Curcumin Light (CCL)

Curcuma longa aus der Familie der Zingiberaceae ist eine Pflanze asiatischen Ursprungs, welche in der asiatischen Küche und der traditionellen chinesischen Medizin eine lange Geschichte hat. Durch Trocknen und Mahlen des Rhizoms wird das charakteristische gelb-orangene Pulver gewonnen, welches als wichtigsten aktiven Wirkstoff Curcumin (CC) enthält. In der klinischen Forschung der letzten Jahre zeigte CC neben seiner antioxidativen Wirkung antikanzerogene, antiinflammatorische sowie neuroprotektive Eigenschaften (39). Auch eine potentielle Rolle von CC in der Behandlung von retinalen Erkrankungen wird untersucht (40). CC als stark lipophile Substanz ist in seiner Bioverfügbarkeit eingeschränkt, sodass zur Anpassung der Pharmakokinetik verschiedene Modifikationen getestet werden (41).

Studien zeigten modulierende Einflüsse von CC sowohl durch epigenetische Mechanismen auf Zielgene als auch durch eine direkte Interaktion mit Zielproteinen (42). Für einige als schädlich betrachtete Faktoren, z.B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF) bei diabetischer Retinopathie, wurde eine reduzierte Expression durch CC beschrieben (43). Dahingegen konnte für bestimmte protektive Faktoren, z.B. *heme oxygenase-1* (HO-1) bei oxidativem Stress, eine Hochregulierung gezeigt werden (44). In einer Studie zur Wirkung von CC bei RP konnten neben einer vermehrten Expression des durch die Mutation verminderten Rhodopsins auch positive Effekte auf die Lokalisation und Fehlagggregation desselbigen beobachtet werden (45).

Frühere Arbeiten deuten darauf hin, dass bei Bestrophinopathien die Expression von BEST1 reduziert sein kann, wobei das Ausmaß mutationsabhängig zu sein scheint (2, 28). In einem M. Best hiPSC-RPE Zellmodell beobachteten Lin et al., dass die Zugabe von CC sowie CC-haltigen Nanopartikeln mit einer erhöhten Expression von BEST1 auf mRNA- und Proteinebene assoziiert war (30).

In dieser Arbeit wurde als CC-Modifikation Curcumin Light (CCL) verwendet (Abb. 3). Dieses wurde im Arbeitskreis von Frau PD Dr. Amslinger an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg entwickelt. Der Wirkmechanismus bleibt nach ersten Erkenntnissen hierbei unverändert, jedoch sollten die vorgenommenen Modifikationen die Stabilität des Wirkstoffes erhöhen, wodurch eventuelle therapeutische Effekte verstärkt werden könnten. Freundlicherweise wurde diese Substanz im Rahmen dieser Arbeit zu Forschungszwecken von Frau PD Dr. Amslinger zur Verfügung gestellt.

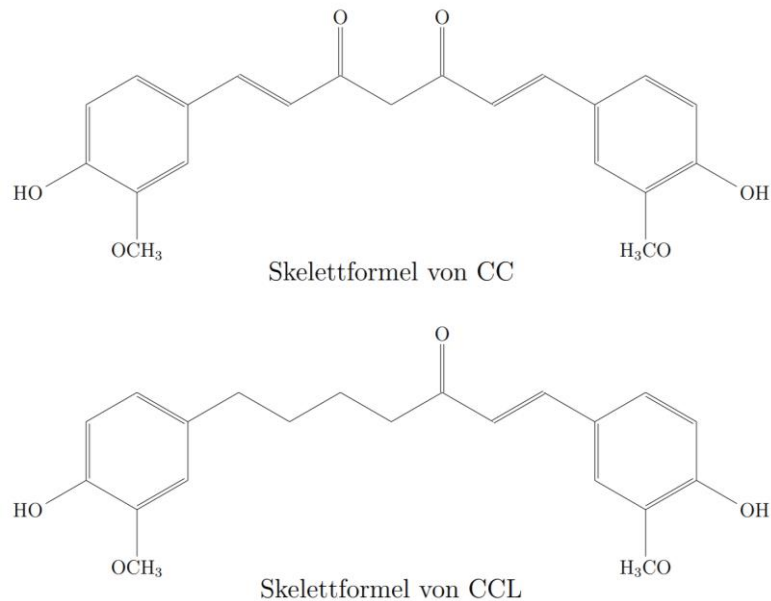


Abbildung 3: Skelettformeln von CC und CCL.

CCL ($C_{21}H_{24}O_5$) weist im Vergleich zu CC ($C_{21}H_{20}O_6$) eine anstatt zwei Enongruppen auf. Abbildung übernommen von Sibylle Wilfling (46).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die Auswirkungen von *BEST1* Mutationen auf die POS-Degradation sind bislang nicht abschließend geklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, mithilfe eines *BEST1*-Knockout (*BEST1*-KO) hiPSC-RPE Modells einen Beitrag zur Grundlagenforschung zu leisten. Untersucht wird, ob es durch den Verlust von *BEST1* zu einer erhöhten Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation nach langfristiger POS-Zugabe kommt. Darüber hinaus soll geprüft werden, ob bereits nach kurzfristiger POS-Stimulation Hinweise auf eine gestörte POS-Degradation detektierbar sind. Damit wird an die Erkenntnisse von Singh et al. aus äquivalenten Versuchen mit *M. Best* hiPSC-RPE angeschlossen (16, 35). Auch die von Nachtigal et al. berichtete Erhöhung des pH_{Lys} in *M. Best* hiPSC-RPE (28) wird im KO-Modell überprüft.

Zusätzlich wurden hiPSC-RPE Zelllinien mit einem Knockout des *leucine-rich repeat-containing protein 8A* (LRRC8A-KO) in die Untersuchung einbezogen. LRRC8A gilt als Schlüsselkomponente von Volumen-regulierten Anionen-Kanälen (*volume regulated anion channels*, VRACs) (47). Frühere Arbeiten deuten darauf hin, dass die Zusammensetzung von VRACs gewebespezifisch ist und in RPE Zellen

möglicherweise BEST1 eine zentrale Rolle innerhalb dieses Kanal-Systems einnimmt (2). Weiterhin zeigen unveröffentlichte Daten aus dem Institut für Humangenetik der Universität Regensburg, dass das Zellvolumen sowohl in LRRC8A-KO als auch in BEST1-KO Zellen im Vergleich zu Kontroll-hiPSC-RPE Zellen signifikant vergrößert ist. Der direkte Vergleich von BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE soll weitere Hinweise auf die Zusammensetzung von VRACs im RPE liefern und helfen, beobachtete Effekte spezifisch dem Verlust von BEST1 oder generellen Volumenregulationsmechanismen zuzuordnen.

Im zweiten Teil beschäftigt sich diese Arbeit mit der möglichen Verwendung von CCL als Therapeutikum bei Bestrophinopathien. Insbesondere sollen die Auswirkungen von CCL auf die BEST1 Expression und Lokalisation in M. Best und ARB Zelllinien untersucht werden.

2. Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	Eurogentec, Seraing, Belgien
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	VWR Chemicals, Ohio, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Panreac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Curcumin (CC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Curcumin Light (CCL)	Universität Regensburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis PD Dr. Amslinger
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Ethanol ≥99,8 p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glucose	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland

Glycin	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Goat serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HCl	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Monensin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaOH	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid 2%	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat ≥99% (SDS)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nigericin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roche Complete	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rotiquant	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.2 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Primär-antikörper	Typ	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
Anti-hBest1	mAK	Maus	1:250	Immunocytochemie (ICC)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-hBest1-334 (334)	pAK	Kaninchen	1:2500	Western Blot (WB)	Dauids Biotechnologie, Regensburg
Anti-Catalase	pAK	Kaninchen	1:10.000	WB	Abcam, Cambridge, UK

Anti-Rhodopsin (1D4)	mAK	Maus	1:2.000	ICC, WB	Prof. Dr. Robert S. Molday, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Kanada
Anti- β -Actin (ACTB)	mAK	Maus	1:10.000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti- β -Catenin (CTNNB1)	mAK	Maus	1:2.000	ICC	BDBioscience, Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
Alexa Fluor™ 488 anti-mouse	1:667	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor™ 594 anti-rabbit	1:667	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IRDye® 680CW Donkey anti-mouse IgG (H+L)	1:10.000	WB	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
IRDye® 800CW Donkey anti-rabbit IgG (H+L)	1:10.000	WB	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA

2.3 Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Lösungen

Versuch	Lösung	Zusammensetzung	Konzentration
ICC	1. Antikörper	PBS Goat Serum Triton A.D. Anti-β-Catenin Anti-BEST1 Anti-1D4	Ad 1 ml 250 µl 50 µl 8,65 ml 1:2000 1:250 1:2000
ICC	2. Antikörper	PBS Goat Serum Triton A.D. Anti-rb/-m DAPI	Ad 1 ml 250 µl 50 µl 8,65 ml 15 µl 10 µl
ICC	Blocking Solution	PBS Goat Serum Triton A.D.	Ad 1 ml 1 ml 150 µl 7,85 ml
ICC	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ A.D.	137 mM 0,27 mM 10 mM 1,8 mM
WB	5x Lämmli Puffer	Bromphenolblau Tris-HCl, pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin A.D.	0,01 % (v/v) 60 mM 5 % (v/v) 2 % (w/v) 10 % (v/v)

WB	Milchpulverlösung	Magermilchpulver PBS	4 %
WB	Sammelgel 3 %	1 M Tris pH 6,8 A.D. Acrylamid 40 % 20 % SDS 10 % APS TEMED	5,5 ml 3,4 ml 1,1 ml 100 µl 100 µl 20 µl
WB	SDS-Laufpuffer, pH 8,6	Tris-HCl Glycin SDS A.D.	0,25 mM 0,2 M 1 % (w/v)
WB	Towbinpuffer, pH 8,7	Glycin Tris Methanol A.D.	190 mM 0,25 mM 20 % (v/v)
WB	Trenngel 10 %	1 M Tris pH 8,8 A.D. Acrylamid 40 % 20 % SDS 10 % APS TEMED	3,8 ml 3,7 ml 2,5 ml 100 µl 100 µl 20 µl
WB	Trenngel 12 %	1 M Tris pH 8,8 A.D. Acrylamid 40 % 20% SDS 10% APS TEMED	3,8 ml 3,2 ml 3,0 ml 100 µl 100 µl 20 µl
WB	Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), pH 7,5	Tris NaCl A.D.	50 mM 150 mM

Zellkultur (ZK)	5%iges Krohne ohne-Medium	DMEM Knock-out Nikotinamid KSOR 5 % Nicht essenzielle Aminosäuren L-Glutamin Gentamycin β-Mercaptoethanol	460 ml 600 mg 25 ml 5 ml 5 ml 250 µl 3,5 µl
ZK pH	MES-Puffer	MES KCl NaCl MgCl ₂ HEPES Glucose A.D. Auf pH 7,4 mit NaOH	20 mM 5 mM 120 mM 1 mM 10 mM 10 mM
ZK pH	pH-Lösungen	MES KCl NaCl A.D. Auf pH mit HCl/NaOH	20 mM 110 mM 20 mM
ZK POS	Taurin-Puffer	NaCl MgCl ₂ Tris-HCl, pH 7,5 Taurin A.D.	5 N 1 M 1 M 100 mM

2.4 Zellkulturmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmaterialien

Material	Hersteller
Dulbecco's PBS (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Fibronectin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gentamicin (50 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution	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
L-Glutamin 200 mM (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nikotinamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Opti-MEM™ Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.5 Kit- und Reaktionssysteme

Tabelle 6: Verwendete Kit- und Reaktionssysteme

System	Hersteller
PureLink® RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.6 Enzyme

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
RevertAid™ Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase-free DNase I	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

2.7 Oligonukleotide und Sonden für quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Alle Primer und Sonden wurden über das kiCqStart® System von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA bestellt.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide und Sonden für qRT-PCR

Name	Sequenz	Gen
APOE sense	CACAGGCAGGAAGATGAA	<i>APOE</i>
APOE anti-sense	CCCAAAGCGACCCAG	<i>APOE</i>
APOE	[6FAM]CTGCGTTGCTGGTCACATTCC[OQA]	<i>APOE</i>
hBEST1 forward	ACATGGATCCTTATTGGGCC	<i>BEST1</i>
hBEST1 reverse	CTGTGACTGGATCAGTGTC	<i>BEST1</i>
hBEST1 probe	[6FAM]ACCTGCTTCCTAATGGGGATGCTTCGC[OQA]	<i>BEST1</i>
CXCL2 sense	CTCTCCCATTATATTTATTGTTTA	<i>CXCL2</i>
CXCL2 anti-sense	GTCACATTGATCTCACTG	<i>CXCL2</i>
CXCL2	[6FAM]ATTCCTCAGCCTCTATCACAGTGG[OQA]	<i>CXCL2</i>
hHPRT1 forward	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	<i>HPRT1</i>
hHPRT1 reverse	TCAAATCCAACAAAGTCTGGC	<i>HPRT1</i>

hHPRT1 probe	[6FAM]GCTTGCTGGTGAAAAGGACCCCACG[OQA]	HPRT1
hNQO1 forward	AAGGTTGCCTGAAAAATGGG	NQO1
hNQO1 reverse	TTGTGGATACTGTCTGAGAGC	NQO1
hNQO1 probe	[6FAM]CCAGATGCTGACTGGCACTGGTGGT[OQA]	NQO1

2.8 HiPSC-RPE Zellen

Tabelle 9: Verwendete Genotypen der hiPSC-RPE Zellen

Name	Klone	Genotyp
MK ^{+/+}	26, 27	Gesunde Kontrolle
MK-A ^{+/+}	27/1, 27/6	Gesunde Kontrolle
MK-A ^{-/-}	27/16, 27/18	BEST1-KO
MK-B ^{-/-}	27/25, 27/47, 27/76	BEST1-KO
MK-D ^{+/+}	27/25, 27/47, 27/76	LRRC8A-KO
CH ^{+/I295del}	298	+/I295del
DK ^{+/Q238R}	PK	+/Q238R
LAlb ^{N99K/R141H}	29, 33	N99K/R141H
TTha ^{A195V/L197PX26}	180	A195V/L197PX26

Tabelle 10: Übersicht der für die einzelnen Versuche verwendeten Zelllinien

Versuch	Verwendete hiPSC-Klone
Langzeit POS	Kontrolle: MK #26, #27 BEST1-KO: MK-B #27/25, #27/42 LRRC8A-KO: MK-D #27/25, #27/47, #27/76
Kurzzeit POS	Kontrolle: MK #26, #27; MK-A #27/1, #27/6 BEST1-KO: MK-B #27/40, #27/42; MK-A #27/16, #27/18 LRRC8A-KO: MK-D #27/25, #27/76
Lysosomen	Kontrolle: MK #26, #27; MK-A #27/1, #27/6 BEST1-KO: MK-B #27/40, #27/42; MK-A #27/16, #27/18 LRRC8A-KO: MK-D #27/25, #27/76

	M. Best: CH #298; DK #PK ARB: LAIb #29; TTha #180
Curcumin	M. Best: CH #298; DK #PK ARB: LAIb #29, #33; TTha #180

2.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
12-Kavitäten Zellkulturplatte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
6-Kavitäten Zellkulturplatte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Deckgläschen (22 x 22 mm)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen (2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen (50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Matrix-Pipetten-Spitzen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ Optical 384-Well-Platte	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Multiply® µStrip 0,2 ml chain	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Nitril Handschuhe	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR-Cups (0,5 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, steril, mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Winsen, Deutschland
Plastikpipetten 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
pluriStrainer 5µm	pluriSelect, Leipzig, Deutschland

pluriStrainer connector ring	pluriSelect, Leipzig, Deutschland
QIAshredder	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
Reagenzienreservoir (25 ml)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stericup® Quick release 500 ml	Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland
SuperFrost® Plus Mikroskop Objektträger	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
TC-Schale 60 Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
ThinCert™ Zellkultur Filter (12 Well)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
ThinCert™ Zellkultur Filter (6 Well)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Wägeschiffchen	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellschaber	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

2.10 Geräte

Tabelle 12: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-jet Pipet Kontroller	Brand, Wertheim, Deutschland
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wettengel, Deutschland
Avanti® J-26S XP Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Axioskop 2 Mot Plus	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Duomax 1030 Rocking Platform Shaker	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Eismaschine	AF 100 Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA

Epithelialen Volt/Ohm Meter (EVOMX)	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Feinwaage Explorer	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Fluoview FV3000 Laser Scanning Microscope	Olympus Life Sciences, Hamburg, Deutschland
Gelkammer Blue Marine200	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glass Plates 18x8 cm	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Leica DM IL Inverted Phase Contrast Microscope 090-135.001	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Matrix Equalizer Pipet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microspin FV 2400	Biosan, Riga, Lettland
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore)
NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Netzgerät Blue Power 500	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Odyssey® FC-Scanner	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Optima Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
pH-Meter Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
QuantStudio 5 qPCR-System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ReaderSpark® Multimode Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Sicherheitswerkbank BDK-SK1800	Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen, Deutschland
Sonorex Super 10P	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland

Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vacusafer	INTEGRA bioscience, Biebertal, Deutschland
Vibra Cell VCX400 Ultrasound device	Sonics & Materials, Newtown, CT, USA
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wasserdestillierapparat	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.11 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

Software	Hersteller
CorelDRAW® X8	Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada
FV31S-SW Software 2.4.1.198	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Image Studio Version 4.0	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
QuantStudio™ Design & Analysis Software Version 1.4.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
R Version 4.2.0	R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (Open Source)
Spark® Control Method Editor	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

3. Methoden

3.1 Differenzierung und Kultivierung von hiPSC-RPE Zellen

Das Institut für Humangenetik der Universität Regensburg verfügt über hiPSC-RPE Zelllinien, welche nach einem institutsinternen Protokoll aus Fibroblasten von Kontrollpersonen oder Patient:innen differenziert wurden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen dreimal passagiert und für mindestens fünf Wochen auf Fibronectin-beschichteten Transwell-Filtern belassen, um eine Polarisierung zu gewährleisten. Alle verwendeten Zellen wurden durchgängig bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellkulturmaterialien wurden bei 4 °C gelagert und vor Verwendung auf 37 °C erwärmt. Das spezielle RPE-Medium (5%iges Krohne ohne, Tabelle 14) wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Lichtmikroskopisch wurde regelmäßig die Dichte des Zellrasens und die hexagonale Form der RPE-Zellen begutachtet sowie auf mögliche Kontaminationen geprüft.

Tabelle 14: Zusammensetzung des 5%iges Krohne ohne-Mediums

Bestandteil	Menge
DMEM Knock-out	460 ml
Nikotinamid	600 mg
KOSR 5%	25 ml
Nicht essenzielle Aminosäuren	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Gentamycin	250 µl
β-Mercaptoethanol	3,5 µl

3.2 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung (TEER)

Zur Beurteilung der Vitalität und Integrität des Zellrasens wurde der transepitheliale elektrische Widerstand gemessen. Hierzu wurde die Sonde zunächst in NaCl-Lösung gereinigt, in 70%igem Ethanol desinfiziert und schließlich in 150 mM NaCl-Lösung kalibriert. Zur Messung wurde die Sonde so positioniert, dass sich die kürzere Elektrode über dem Filter befand und die längere im unteren Medium. Pro Filter

wurden fünf Messungen durchgeführt, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Von diesem Mittelwert wurde der Wert für den Leerfilter abgezogen.

3.3 Isolierung von Fotorezeptor-Außensegmenten (POS)

Die verwendeten POS wurden aus Schweine-Augen aus dem örtlichen Schlachthaus isoliert. Dazu wurden die Augen auf Eis gekühlt, entlang der Ora serrata mit einem Skalpell halbiert und die Retinae vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Retinae sorgsam abgelöst und gesammelt in verschlossenen Röhrchen bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung der Fotorezeptoren wurden die Retinae langsam auf Eis aufgetaut und mit dem Protease-Inhibitor Roche Complete versetzt. Dann wurden sie mit schrittweise kleiner werdenden Pipetten homogenisiert und anschließend durch eine Mullbinde gefiltert. Für die Ultrazentrifugation wurden Sucrose-Lösungen in Beckmann Coulter-Röhrchen in aufsteigender Konzentration (20, 27, 33, 41, 50, 60 %) unterschichtet. Das Retina-Homogenisat wurde vorsichtig als oberste Schicht in die Röhrchen pipettiert, um eine Durchmischung der Sucrose-Schichten zu verhindern. Die Zentrifugation erfolgte in einer Beckman Ultrazentrifuge mit einem SW40 Rotor bei 26.000 rpm und 4 °C für 2 h. Die rosafarbene POS-enhaltende Fraktion wurde abgenommen und bei 7500 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit Opti-MEM Medium gewaschen und schließlich mit 25 ml Opti-MEM Medium resuspendiert, mit 25 µl Penicillin/Streptomycin versetzt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Als Proteinstandard für die Kalibrierungskurve wurden BSA-Lösungen der Konzentrationen 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 und 2000 µg/ml 1:100 in Bradford-Reagenz (5x Rotiquant 1:5 in Millipore H₂O) gegeben. Die zu messenden POS wurden ebenfalls 1:100 in Bradford-Reagenz gegeben. Alle Proben wurden gevortext und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden je 100 µl auf eine durchsichtige 96-Well-Microtiter-Platte pipettiert und im Spark® Multimode Microplate Reader wurde die Absorbanz bei 595 nm gemessen.

Zur Zugabe auf die Zellen wurde die POS-Lösung fünf Minuten im Ultraschallbad sonifiziert und mit Krohne ohne-Medium auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

3.4 Langzeit POS-Zugabe

Zur Analyse der Rolle von BEST1 bei der POS-Degradation wurden Kontroll- und Knockout hiPSC-RPE aus Zellen desselben gesunden Spenders (MK) verwendet. Diesen wurde an fünf Tagen pro Woche POS in den Konzentrationen 2,5 bzw. 10 POS pro Zelle zugegeben. Nach vier, sechs bzw. acht Wochen wurde eine zweiwöchige Karenzzeit eingehalten.

Von den Transwell-Filtern wurden Teile für die Mikroskopie abgetrennt. Vom übrigen Filter wurden die Zellen für eine qRT-PCR mit Lysis-Puffer mit 1:100 β -Mercaptoethanol gelöst und bei -80 °C gelagert.

3.5 Analyse der POS-Degradation

Die Zellen wurden mit 15 POS pro Zelle in Opti-MEM für 7 bzw. 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie viermal mit PBS gewaschen. Zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h wurden sie zur Analyse der POS-Degradation mittels Western Blot geerntet.

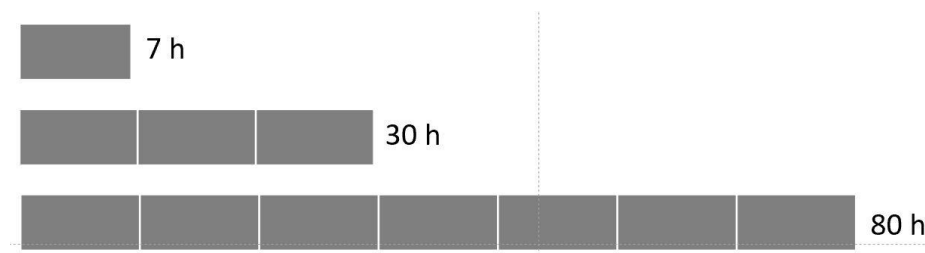
3.6 Analyse des lysosomalen pH-Werts (pH_{Lys})

Zur Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit TrypLE für 20 min inkubiert. Die gelösten Zellen wurden pelletiert, in 5%igem Krohne ohne-Medium gelöst und auf zuvor mit Fibronectin beschichtete 96-Well-Microtiter-Platten gegeben. Nach der Passage wurden die Zellen eine Woche kultiviert, bevor mit der POS-Zugabe begonnen wurde. Die POS-Zugabe erfolgte fünfmal wöchentlich je nach Versuchsanordnung in den Konzentrationen 0, 2,5, 10 und 20 POS pro Zelle für eine oder zwei Wochen.

3.7 Wirkstoffbehandlung mit Curcumin Light (CCL)

CC und CCL wurden in DMSO gelöst. Bei jedem Versuch wurde den Kontrollzellen nur DMSO zugegeben.

A



B

7 h Ansatz		DMSO	CC/CCL	Ethanol	CHX
mRNA	Kontrolle	+			
	Probe	+	+		
Protein	Steady state	+		+	
	Kontrolle	+		+	+
	Probe	+	+	+	+

Abbildung 4: Versuchsanordnung Wirkstoffbehandlung mit CCL.

In einem Versuchsansatz wurde ARB-Zellen CC bzw. CCL in der Konzentration 20 μ M zugegeben. Bei der Inkubation über 7 h erfolgte eine einmalige Gabe, bei der Inkubation über 30 bzw. 80 h wurde zweimal täglich der Wirkstoff aufgetragen (Abbildung 4A). Beim 7 h Ansatz wurde für die Protein-Analyse zur Translationshemmung Cycloheximid (CHX) hinzugegeben. Entsprechend wurden die Proben wie folgt behandelt: steady state (Ethanol, DMSO), unbehandelte Kontrolle (CHX, DMSO) und die behandelten Proben (CHX, CCL) (Abbildung 4B). Im 30 und 80 h Ansatz erfolgte die Behandlung analog zur mRNA-Analyse mit CC bzw. CCL und ohne CHX.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde M. Best und ARB-Zellen CC bzw. CCL in der Konzentration 30 μ M zugegeben. Die Inkubation erfolgte über 30 h bei zweimal täglicher Gabe des Wirkstoffs.

Aus den Transwell-Filtern wurden Teile für die Mikroskopie herausgetrennt. Für eine qRT-PCR wurden Zellen mit Lysis-Puffer mit 1:100 β -Mercaptoethanol gelöst und bei -80 °C gelagert. Außerdem wurden Proben für eine Western Blot Analyse gewonnen.

3.8 Immunozytochemie (ICC)

Die Schnitte wurden für 10 min in 4%igem Paraformaldehyd fixiert, für 25 min mit Blocking Solution geblockt und jeweils über Nacht bei 4 °C mit der primären und sekundären Antikörper-Lösung (Tabelle 15) inkubiert. Nach jedem Schritt wurde jeweils dreimal über 10 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit dem Skalpell halbiert und je eine Hälfte gewendet auf dem Objektträger platziert, um eine richtige Orientierung der Filter zu gewährleisten. Die Fixierung erfolgte mit Dako Fluorescence Mounting Medium.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Lösungen für die ICC

Lösung	Bestandteil	Menge
Blocking Lösung	10x PBS	1300 μ l
	Goat Serum	1300 μ l
	20 % Triton	195 μ l
	A.D.	10.205 μ l
Primäre Antikörper-Lösung	10x PBS	1300 μ l
	Goat Serum	325 μ l
	20 % Triton	65 μ l
	Primäre Antikörper	Tabelle 2
	A.D.	11.245 μ l
Sekundäre Antikörper-Lösung	10x PBS	1300 μ l
	Goat Serum	325 μ l
	20 % Triton	65 μ l
	DAPI	10 μ l
	Sekundäre Antikörper	Tabelle 3
	A.D.	11.245 μ l

Alle Schnitte wurden unter dem Zeiss Axioskop 2 Mot Plus betrachtet. Repräsentative Proben wurden mit dem Konfokal Mikroskop Fluoview FV3000 fotografiert.

3.9 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qRT-PCR

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem PureLink® RNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers inklusive DNA-Verdau. Die isolierte RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und anschließend durchgängig auf Eis gehalten. Mit einem NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer wurde die Konzentration gemessen und die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

Zur cDNA-Synthese wurde die RNA auf Eis aufgetaut. 500 ng wurden mit RNase-freiem Wasser und 1 µl Random Hexamer Primer gemischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert (Annealing, Tabelle 17). Die Proben wurden zügig auf Eis abgekühlt, mit dem Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese (Tabelle 16) gemischt und anschließend wieder in den Thermocycler gegeben (Tabelle 17). Die cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 10 ng/µl verdünnt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese

Bestandteil	Menge
5x Puffer	1:5
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	2 µl
RevertAid™ Reverse Transkriptase	0,5 µl

Tabelle 17: Programm Thermocycler

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Annealing	65	5
cDNA-Synthese und Hitzeinaktivierung	25	10
	42	60
	70	10

Für die qRT-PCR wurden 2,5 µl der cDNA und 7,5 µl des Reaktionsansatzes (Tabelle 18) in Triplikaten auf eine 384-Well-Platte pipettiert. Hierbei lief auf jeder Platte neben dem zu untersuchenden Gen *HPRT1* als interner Standard mit. Das Programm für das QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System ist in Tabelle 19 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta t$ Methode.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR

Bestandteil	Menge
Milipore	0,375 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
Master Mix	5 µl
Sonde	0,125 µl
cDNA (10 ng/µl)	2,5 µl

Tabelle 19: Programm qRT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	40 s
Annealing	60 °C	60 s
Elongation	72 °C	2 min

3.10 Gewinnung von Protein-Proben, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die Zellen wurden vom Transwell-Filter abgeschabt, zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 250 µl 1x Lämmli-Puffer (Tabelle 20) bei -80 °C gelagert.

Tabelle 20: Zusammensetzung des 5x Lämmli-Puffers

Bestandteil	Menge
Milipore	7,2 ml
SDS	2,4 g
Glycerin 87%	13,8 ml
β-Mercaptoethanol	3 ml
Bromphenolblau	120 mg

1x Lämmli-Puffer: 2 ml 5x Lämmli-Puffer ad 10 ml 1x TBS

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteinproben auf Eis aufgetaut und 6 s bei einer Amplitude von 30 % sonifiziert. Die Proben zur BEST1 Analyse wurden 5 min bei 94 °C gekocht. Für die Analyse von

BEST1 wurden 10%ige, für die von Rhodopsin 12%ige Trenngele (Tabelle 21) verwendet.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Gel	Bestandteil	Menge
Sammelgel (3 %)	1 M Tris pH 6,8	5,5 ml
	A.D.	3,4 ml
	Acrylamid 40 %	1,1 ml
	20 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	20 µl
Trenngel (10 %)	1 M Tris pH 8,8	3,8 ml
	A.D.	3,7 ml
	Acrylamid 40 %	2,5 ml
	20 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	20 µl
Trenngel (12 %)	1 M Tris pH 8,8	3,8 ml
	A.D.	3,2 ml
	Acrylamid 40 %	3,0 ml
	20 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	20 µl

Es wurden 70 µl der Probe geladen sowie 5 µl der PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Die Elektrophorese lief für 1:40 h bei 150 V.

Für den Western Blot wurde das Bio-Rad Transblot Transfer System benutzt. Hierzu wurde eine Immobilon-FL PVDF Membran 30 s in Methanol aktiviert und anschließend 2 min mit Whatman-Papier und dem Protein-enthaltenden Gel in Towbin-Puffer inkubiert. In der Reihenfolge Papier, Membran, Gel, Papier wurden diese in den Transblot überführt. Der Western Blot lief 40 min mit 24 V. Danach wurden die Membranen für 1 h in 4%iger Milch-Lösung geblockt und jeweils über Nacht bei 4 °C

mit der primären und sekundären Antikörper-Lösung (Tabelle 22) inkubiert. Nach jedem Schritt wurde dreimal für zehn Minuten mit 1x TBS gewaschen.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Lösungen für den Western Blot

Lösung	Bestandteil	Menge
Blocking-Lösung	Milchpulver	2,5 g
	1x TBS	50 ml
Primäre Antikörper-Lösung	Primäre Antikörper	Tabelle 2
	Natriumazid	1:1.000
	Odyssey Blocking Buffer	500 µl
	1x TBS	19,5 µl
Sekundäre Antikörper-Lösung	Sekundäre Antikörper	Tabelle 3
	Odyssey Blocking Buffer	500 µl
	1x TBS	19,5 µl

Abschließend wurden die Membranen im Odyssey® FC-Scanner analysiert und mit der Image Studio Software quantifiziert.

3.11 Messung des lysosomalen pH-Werts (pH_{Lys})

Zur Auswertung wurde das Medium abgenommen, die Platte zweimal mit PBS und einmal mit MES-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Farbstoff LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160 1 µM in MES-Puffer aufgetragen. Nach 5 min bei 37 °C wurde auch dieser abgenommen und die Platte mit PBS und MES-Puffer gewaschen. Nun wurde pro Zelllinie in je eine Reihe (sechs Wells) MES-Puffer bzw. die Kalibrierungs-Lösungen (pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5) gegeben. Zur Auflösung des intrazellulären pH-Werts wurden die Ionophore Nigericin und Monensin in der Konzentration 10 µM zu den Kalibrierungs-Lösungen hinzugegeben. Nach weiteren 15 min Inkubation wurden im Spark® Multimode Microplate Reader die Fluoreszenzintensitäten bei 330 nm und 385 nm analysiert.

3.12 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Programmiersprache R Version 4.2.0 (48). Die Daten wurden mittels des Shapiro-Wilk-Test mit der *shapiro.test* Funktion auf eine Normalverteilung hin getestet. Bei einem Mittelwert-Vergleich von zwei Gruppen wurde bei normalverteilten Daten ein T-Test mittels der *t.test* Funktion durchgeführt. Bei Daten ohne Normalverteilung wurde ein Wilcoxon Rangsummentest mittels der *wilcox.test* Funktion verwendet. Wurden mehr als zwei Gruppen untersucht, wurde bei normalverteilten Daten eine ANOVA mittels der *aov* Funktion genutzt und bei nicht normalverteilten Daten ein Kruskal-Wallis Test mittels der *kruskal.test* Funktion. Falls mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, wurde ein Dunn-Test durchgeführt um für multiples Testen zu korrigieren. Dies erfolgte mittels der *dunnTest* Funktion, welche im FSA package v0.9.3 enthalten ist (49). Falls nicht anders angegeben sind alle verwendeten Funktionen in R implementiert.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu den Auswirkungen eines BEST1-Knockouts in hiPSC-RPE Zellen

Am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg standen zu Beginn dieses Projektes verschiedene hiPSC-RPE-Zelllinien zur Verfügung. Diese umfassten Zelllinien von gesunden Spender:innen (Kontroll-hiPSC-RPE), von Patient:innen mit M. Best oder ARB sowie menschliche Zelllinien, bei denen LRRC8A oder BEST1 mittels der CRISPR-Technologie gezielt ausgeschaltet wurde (LRRC8A-KO bzw. BEST1-KO). Die Kontroll- und Patient:innen-Zelllinien wurden bereits in einer früheren Arbeit am Institut charakterisiert (28). Die hier verwendeten BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien wurden alle aus Stammzellen desselben gesunden Spenders hergestellt (Spender „MK“). Für den BEST1-KO wurden zwei unterschiedliche *single guide* RNAs (sgRNAs) verwendet (BEST1-KO-A und BEST1-KO-B) um *offtarget*-Effekte zu minimieren.

4.1.1 Analyse der BEST1 Expression in den Knockout hiPSC-RPE Zelllinien

Zur Bestätigung der vollständigen Abwesenheit von BEST1 Protein in den BEST1-KO Zelllinien wurden immunozytochemische Färbungen (siehe 3.8) mit einem spezifischen Antikörper gegen BEST1 durchgeführt. Als Referenz für eine Lokalisation an der basolateralen Seite der Zellmembran wurde β -Catenin (CTNNB1) gewählt. Die Betrachtung erfolgte mit dem konfokalen Mikroskop.

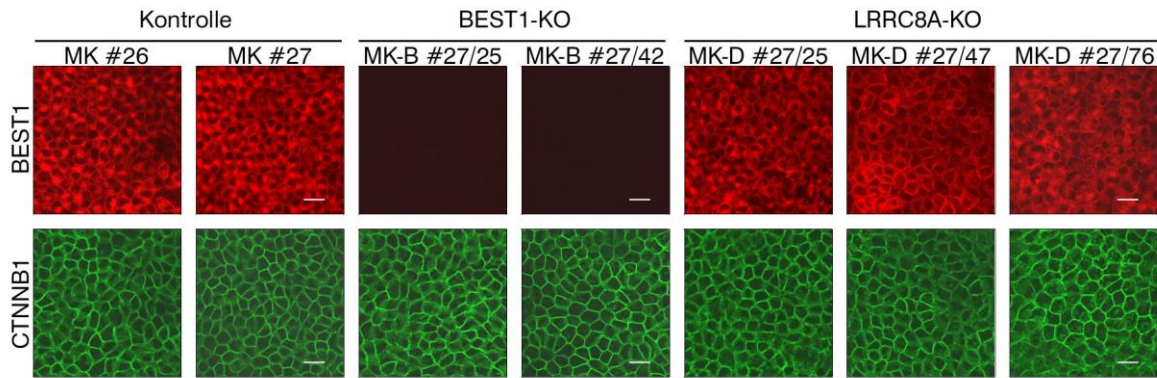


Abbildung 5: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildung zur Lokalisation und Expression von BEST1 in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen.

Die Proben wurden gegen BEST1 (rot) und CTNNB1 (grün) gefärbt. Maßstabsleiste: 20 µm. In den Kontroll- und LRRC8A-KO Zelllinien ist eine regelhafte membranständige Lokalisation von BEST1 zu erkennen. In den BEST1-KO Zelllinien liegt keine BEST1 Proteinexpression vor.

Die in Abbildung 5 dargestellten hiPSC-RPE Zellen wurden zwölf Wochen auf Transwell-Filtern kultiviert. Es ist zu erkennen, dass alle Zelllinien die für RPE-Zellen typische hexagonale Form zeigen. CTNNB1 ist regelrecht angefärbt und ausgebildet. In den beiden Kontroll-Zelllinien sowie den drei LRRC8A-KO Zelllinien zeigt BEST1 eine membranständige Lokalisation. Hingegen ist in den beiden BEST1-KO Zelllinien kein BEST1 Protein sichtbar. Somit stellen die verwendeten Zelllinien geeignete Modelle zur Untersuchung der Auswirkungen eines BEST1-KO dar. Der Nachweis für das Fehlen von LRRC8A in den drei LRRC8A-KO Zelllinien erfolgte bereits in Vorarbeiten am Institut für Humangenetik.

4.1.2 Analyse der Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation nach Langzeit POS-Zugabe



Abbildung 6: Schema zur Langzeit POS-Konditionierung.

Nach dem Schema in Abbildung 6 wurden zwei Kontroll- (MK #26 und #27), zwei BEST1-KO (MK-B25 und 42) und drei LRRC8A-KO (MK-D25, 47 und 76) Zelllinien (n=2) über einen Zeitraum von vier bis acht Wochen mit POS in den Konzentrationen

2,5 und 10 POS pro Zelle behandelt. Nach einer zweiwöchigen POS-Karenz erfolgte die mikroskopische Analyse der Autofluoreszenz sowie der POS-Akkumulation. Dazu wurden kleine Abschnitte der Transwell-Filter entnommen und gegen Rhodopsin gefärbt. Der verbleibende Teil der Transwell-Filter wurde für die RNA-Analyse genutzt.

Pro Konstellation von Inkubations-Zeitraum (4, 6, 8 Wochen POS Zugabe), POS-Konzentration (2,5, 10 POS pro Zelle) und Zelllinie (MK #26 und #27, MK-B25 und 42, MK-D25, 47 und 76) wurde jeweils ein Transwell-Filter analysiert. Mittels ICC und Konfokalmikroskop wurde untersucht, ob das Fehlen von BEST1 Auswirkungen auf die Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation hat. In M. Best hiPSC-RPEs wurde beides im Vergleich zur Kontrolle als verstärkt beschrieben (35). Um beim Auftreten dieser Effekte zu beurteilen, ob eine Zellschwellung ursächlich beitragen könnte, wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein LRRC8A-KO betrachtet. Die Arbeitshypothese war, dass im BEST1-KO im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation sichtbar wird. Dieser Effekt sollte sich bei einer höheren POS-Konzentration und verlängerten POS-Zugabe verstärken.

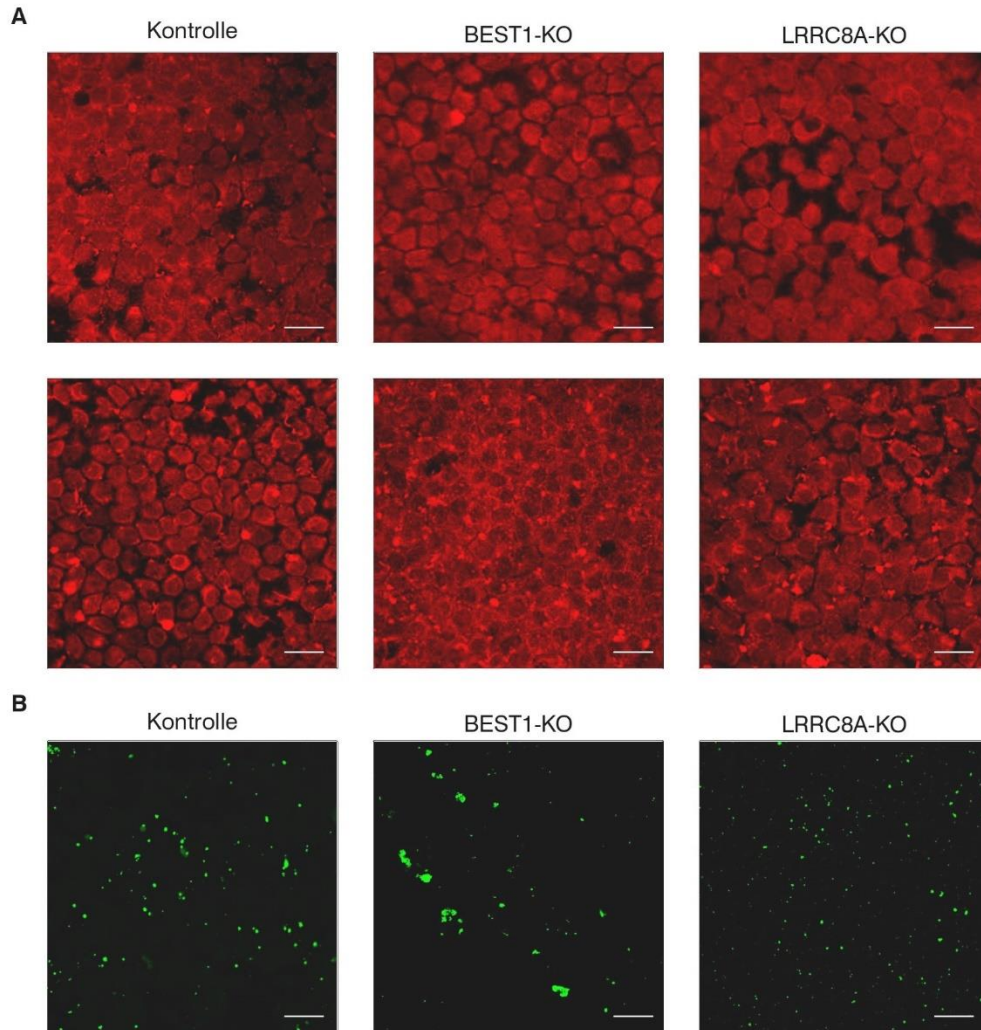


Abbildung 7: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Langzeit-Zugabe von POS.

Abgebildet sind hiPSC-RPE denen über 8 Wochen POS in der Konzentration 10 POS/Zelle zugegeben wurden. Maßstabsleiste 20 μm .

(A) Autofluoreszenzaufnahmen im roten Kanal (Exzitationswellenlänge: 595 nm) von jeweils zwei verschiedenen Stellen bzw. Ebenen von Transwell-Filtern der angegebenen hiPSC-RPE Zelllinien.

(B) Immunzytochemische Färbung von Rhodopsin (grün) mit dem spezifischen Antikörper Anti-Rhodopsin-1D4.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien nach 8-wöchiger Zugabe von 10 POS pro Zelle. Die weiteren Analysebedingungen zeigten analoge Ergebnisse. Auf die Darstellung wurde daher an dieser Stelle verzichtet.

Die Autofluoreszenz ist auf der roten Ebene zu erkennen (Abbildung 7A). Im Zuge der Auswertung wurden alle Filter in ihrer Gänze betrachtet. Die zwei dargestellten Bilder

pro Zelllinien wurden an verschiedenen Stellen des Filters bzw. auf unterschiedlichen Ebenen gemacht. In der oberen Reihe zeigt sich die Autofluoreszenz intrazellulär und in ihrer Intensität homogen. In der Kontrolle zeigt sich in der oberen rechten Ecke der Aufnahme ein weniger signal-intenses Areal. Diese Schwankungen waren jedoch in allen Filtern unabhängig vom Zelltyp sichtbar, ohne dass sich ein Trend bestimmen ließ. In der unteren Reihe von Abbildung 7A sieht die Autofluoreszenz anders aus. Es sind vermehrt zellmembranständige und extrazellulär liegende Ansammlungen autofluoreszenten Materials zu erkennen. In der BEST1-KO Abbildung wirken diese diffuser verteilt, während sie in der Kontrolle und im LRRC8A-KO eher konzentriert aussehen. Auch diese Unterschiede zeigten sich jedoch im selben Ausmaß innerhalb desselben Filters. Aufgrund der großen Heterogenität in Menge und Verteilungsmuster, auch innerhalb derselben Proben, sowie der starken Orts- und Ebenenabhängigkeit auf dem Transwell-Filter konnte keine verlässliche Quantifizierung der Autofluoreszenz erfolgen. Somit kann keine Aussage getroffen werden, ob die Autofluoreszenz bei Langzeit POS-Zugabe in hiPSC-RPE Zellen durch einen BEST1-KO verstärkt wird.

Zur weiteren Analyse wurden akkumulierte POS mit einem Antikörper gegen Rhodopsin sichtbar gemacht (Abbildung 7B). Bei Betrachtung fällt auf, dass in der BEST1-KO Probe das Rhodopsin eher in größeren Akkumulationen vorzuliegen scheint, während es in der Kontrolle und im LRRC8A-KO eher punktförmig verteilt ist. Wie bei der Autofluoreszenz ist dies jedoch kein Zelllinien-spezifischer Effekt, sondern zeigte sich in Varianten genauso innerhalb desselben Filters. Bei der vergleichenden Betrachtung von Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation fiel auf, dass die Autofluoreszenz teils auch im grünen Spektrum sichtbar war. Aus diesem Grund wurde auch auf eine Quantifizierung der Rhodopsin-Menge verzichtet. Eine klare Übereinstimmung im Ausmaß der Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation konnte nicht festgestellt werden.

Bei der Analyse der Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation nach Langzeit POS-Zugabe konnte kein klarer Trend nach Zelllinie, Dauer oder Konzentration der POS-Zugabe gezeigt werden. Eine eindeutige Aussage ist aufgrund der komplexen Analysebedingungen an dieser Stelle nicht zu treffen.

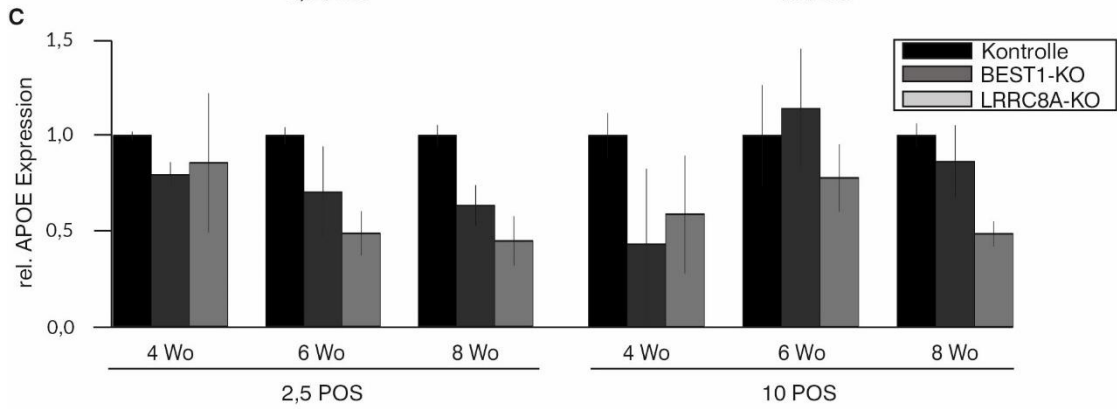
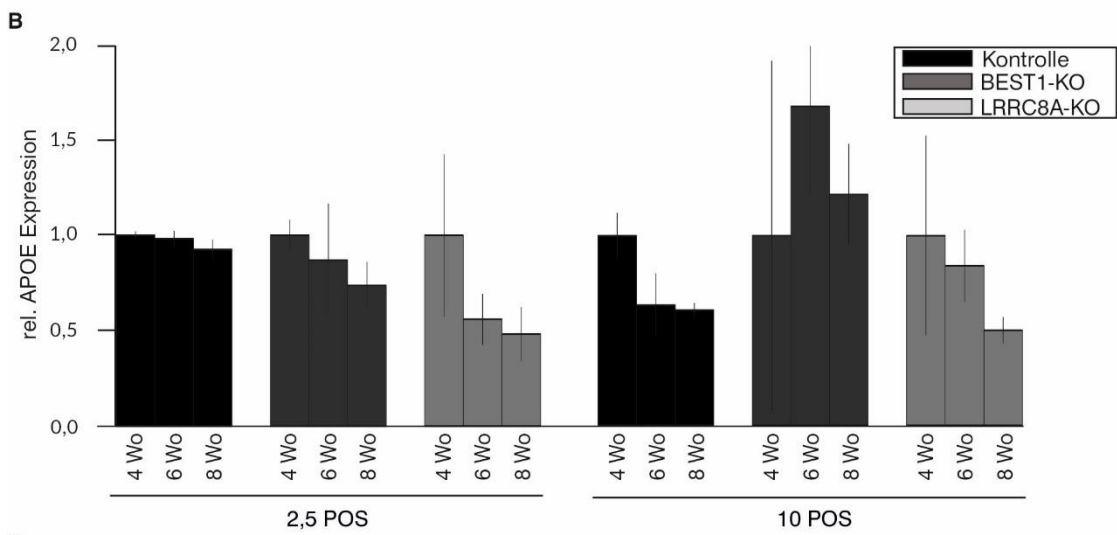
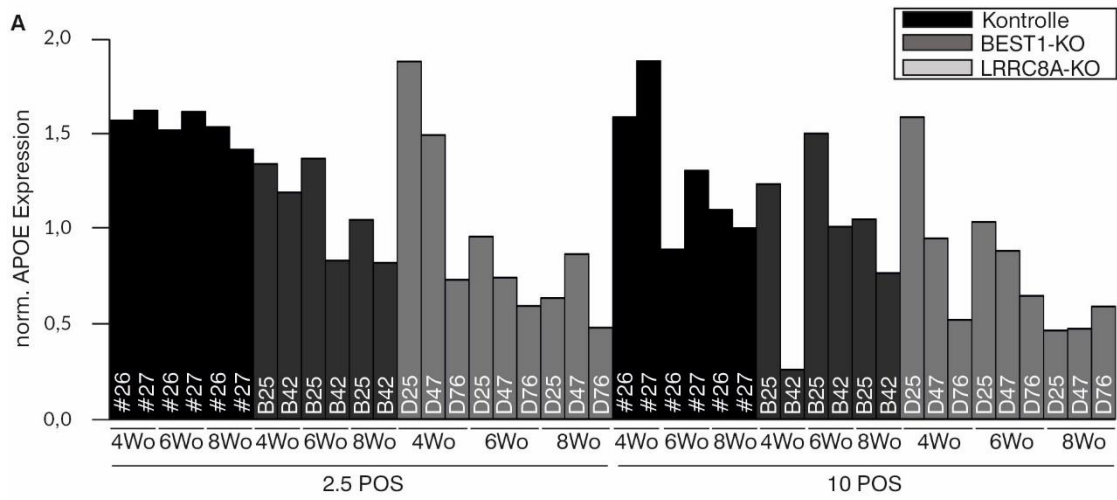
4.1.2 Analyse von Drusen-, Seneszenz- und Stressmarkern nach Langzeit POS-Zugabe

Von den Transwell-Filtern aus 4.1.1 wurden zusätzlich RNA-Proben gewonnen wie in 3.9 beschrieben. Es wurde für Apolipoprotein E (APOE), *C-X-C motif chemokine ligand 2* (CXCL2) und *NAD(P)H quinone dehydrogenase 1* (NQO1) eine qRT-PCR durchgeführt, um die Auswirkungen der Langzeit POS-Zugabe auf Drusenbildung, Seneszenz und Stress in den behandelten hiPSC-RPE Zellen zu untersuchen.

4.1.2.1 APOE als Drusenmarker

Bei degenerativen Prozessen wurde eine erhöhte Expression von APOE im RPE beschrieben (50). Am häufigsten zeigen sich APOE-haltige Ablagerungen zwischen dem RPE und der Bruch-Membran als sogenannte Drusen. Eine Anreicherung von Drusen ist ein charakteristisches Merkmal der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) (50).

In dieser Studie wurde untersucht, ob die langfristige Zugabe von POS die Expression von APOE im RPE beeinflusst. Zudem wurde analysiert, ob dieser Effekt durch das Fehlen von BEST1 modifiziert wird. Hierzu wurden Kontroll-Zelllinien sowie BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien über 4 bis 8 Wochen mit POS in den Konzentrationen 2,5 und 10 POS pro Zelle behandelt, gefolgt von einer zweiwöchigen Phase der POS-Karenz (Abbildung 6). Anschließend wurde die APOE Expression auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR untersucht.



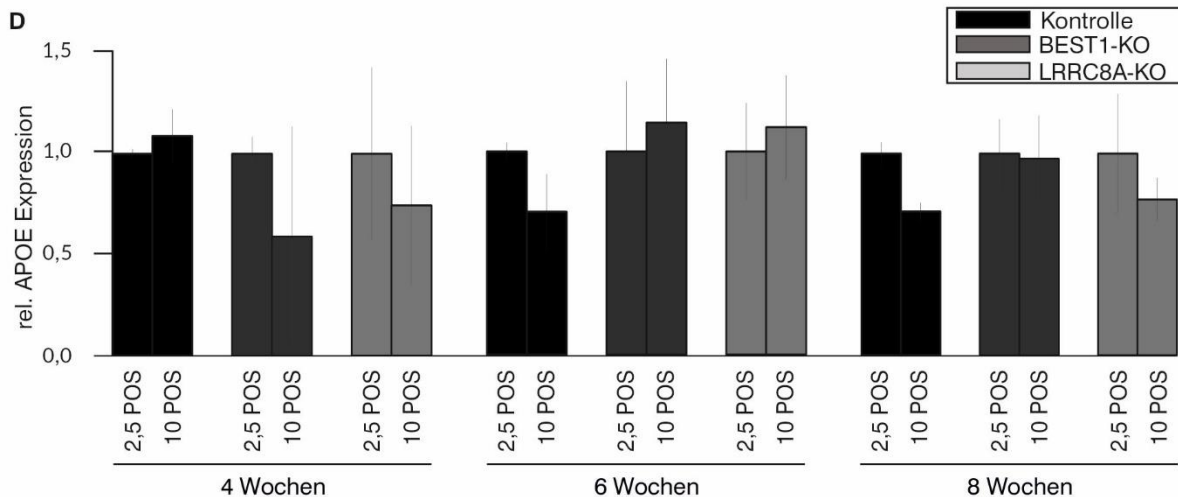


Abbildung 8: mRNA-Expression von APOE in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Langzeit-POS-Zugabe.

hiPSC-RPE Zellen wurden über 4, 6 bzw. 8 Wochen POS in den Konzentrationen 2,5 bzw. 10 POS/Zelle zugegeben. Aus einer Probe pro Zelllinie (n=2) wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert.

(A) mRNA-Expression von APOE in hiPSC-RPE Zellen von Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien. Es wurden technische Triplikate gemessen und gegen das Haushaltsgen HPRT1 normalisiert.

(B) Die mRNA-Werte der APOE Expression der Kontroll-, BEST1-KO bzw. LRRC8A-KO Zelllinien wurden gepoolt und auf die jeweilige 4 Wochen Probe relativiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Es ist kein Trend in der APOE Expression abhängig von der Dauer der POS-Zugabe zu erkennen.

(C) Die mRNA-Werte der APOE Expression wurden auf die jeweilige Kontroll-Probe relativiert. Es ist kein Trend abhängig vom Zelltyp zu erkennen.

(D) Die mRNA-Werte der APOE Expression wurden auf die jeweilige 2,5 POS Probe relativiert. Es ist kein Trend abhängig von der zugegebenen POS-Menge zu erkennen.

Abbildung 8A zeigt die Mittelwerte der APOE mRNA-Expression aus den technischen Triplikaten, normalisiert auf die HPRT1 mRNA-Expression. Zur klareren Darstellung wurden die Werte je nach Fragestellung gepoolt und relativiert. Aufgrund zu kleiner Stichprobengröße (n=2) konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

Sollte eine Veränderung der APOE mRNA-Expression sichtbar werden, wäre zu erwarten, dass diese im Verlauf der Zeit steigt und bei einer erhöhten Zugabe von POS höher ist. Um den Effekt der Zeit zu beurteilen dient Abbildung 8B. Betrachtet man die Ergebnisse der jeweils gleichen Zelltypen (Kontrolle, BEST1-KO, LRRC8A-KO) unter der Zugabe derselben POS-Konzentration (2,5, 10 POS pro Zelle) ist in fünf von sechs Gruppen ein Absinken der APOE mRNA-Expression im Verlauf der Zeit zu erkennen. Lediglich in der BEST1-KO mit 10 POS pro Zelle Gruppe ist die Expression nach sechs

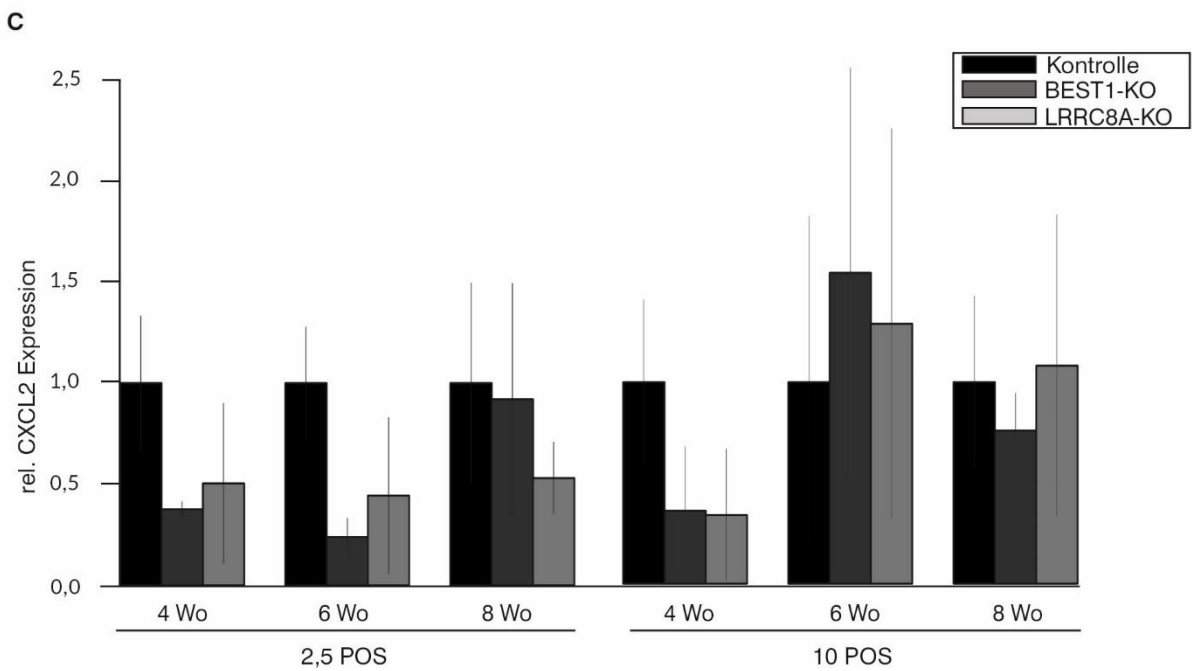
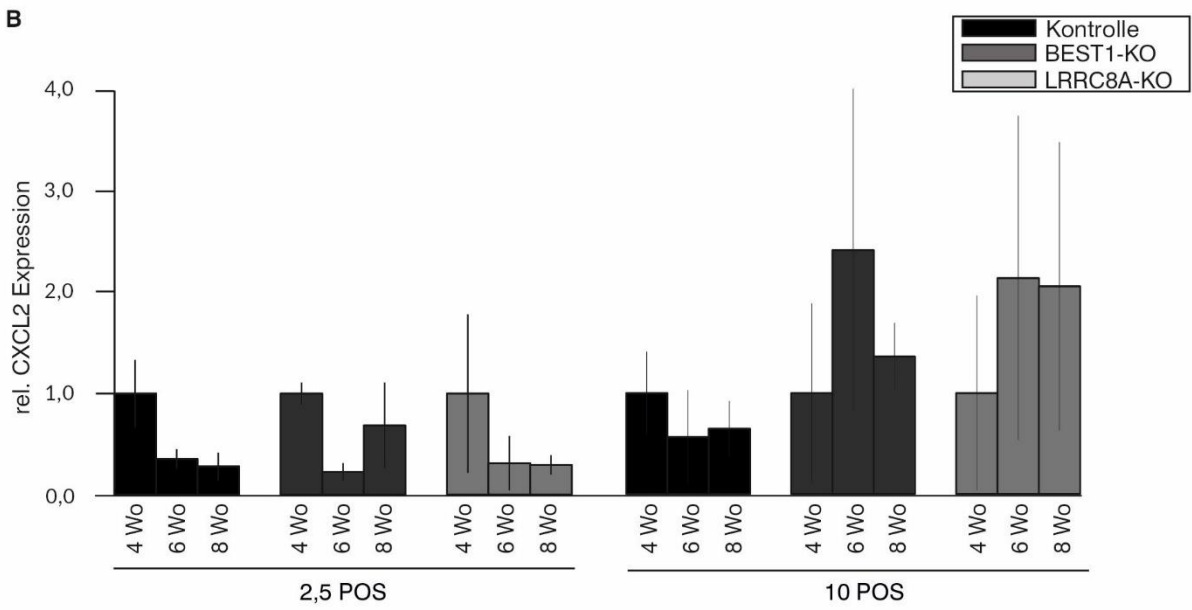
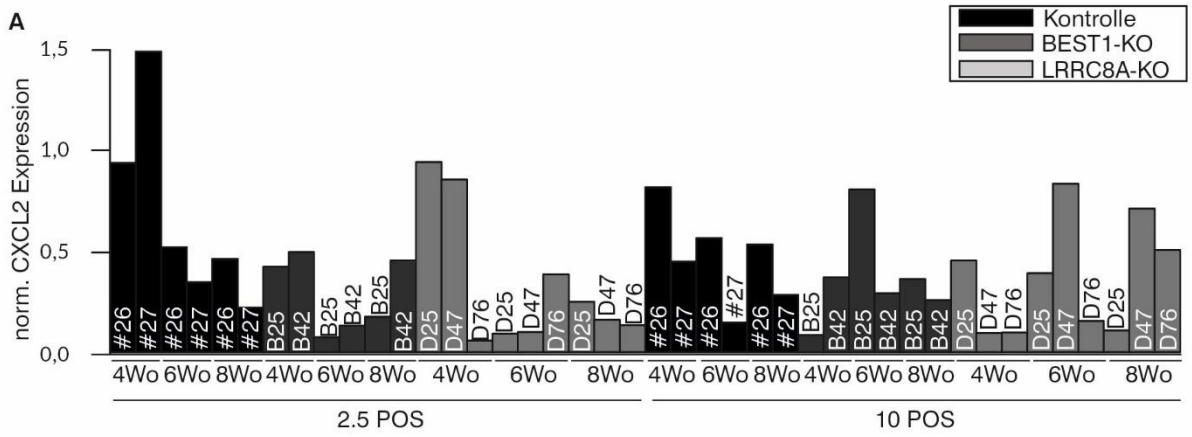
Wochen höher als nach vier, jedoch sinkt sie zum acht Wochen Zeitpunkt wieder ab. Beim Vergleich der zugegebenen POS-Konzentrationen (Abbildung 8D) ist lediglich in der vier Wochen Kontroll-Probe sowie der sechs Wochen BEST1-KO und LRRC8A-KO Probe der erwartete höhere Wert bei der Zugabe von 10 POS pro Zelle angedeutet. In den anderen sechs Gruppen scheint bei Zugabe von weniger POS mehr APOE vorhanden zu sein.

Anhand von Abbildung 8C sollte der Effekt eines BEST1- und LRRC8A-KO auf die APOE mRNA-Expression beurteilt werden. Zum vier Wochen Zeitpunkt ist die APOE mRNA-Expression im BEST1-KO niedriger als in der Kontrolle, im LRRC8A-KO liegt sie dazwischen. Zum sechs Wochen Zeitpunkt ist sie in der 2,5 POS Gruppe im LRRC8A-KO am niedrigsten und in der 10 POS Gruppe im BEST1-KO am höchsten. Nach achtwöchiger POS Zugabe zeigt sich ein Abfall von der Kontrolle über den BEST1-KO zum LRRC8A-KO. Somit präsentieren sich die Ergebnisse der APOE mRNA-Expression zwischen den Zelllinien sehr heterogen und ohne erkennbaren Trend.

Die Langzeit-POS-Zugabe hat keinen Einfluss auf die APOE mRNA-Expression in hiPSC-RPE Zellen. Weder die Dauer noch die Konzentration der POS-Behandlung zeigen einen konsistenten Effekt. Ebenso ist im Vergleich zwischen Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO Zellen kein klarer Trend ersichtlich.

4.1.2.2 CXCL2 als Seneszenzmarker

Seneszenz beschreibt einen irreversiblen Wachstumsarrest in alternden oder pathologisch veränderten Zellen. Trotz Verlust ihres Proliferationspotentials bleiben sie metabolisch aktiv und sezernieren verschiedene Faktoren, unter anderem CXCL2 (51). In dieser Studie wurde die CXCL2 mRNA-Expression in hiPSC-RPE Zellen bis zu einem Alter von 10 Wochen nach abgeschlossener Reifung analysiert. Ziel war es, das Ausmaß der Seneszenz in den Zellen zu bestimmen und zu untersuchen, ob die langfristige POS-Zugabe oder der Knockout von BEST1 bzw. LRRC8A diesen Prozess beeinflusst.



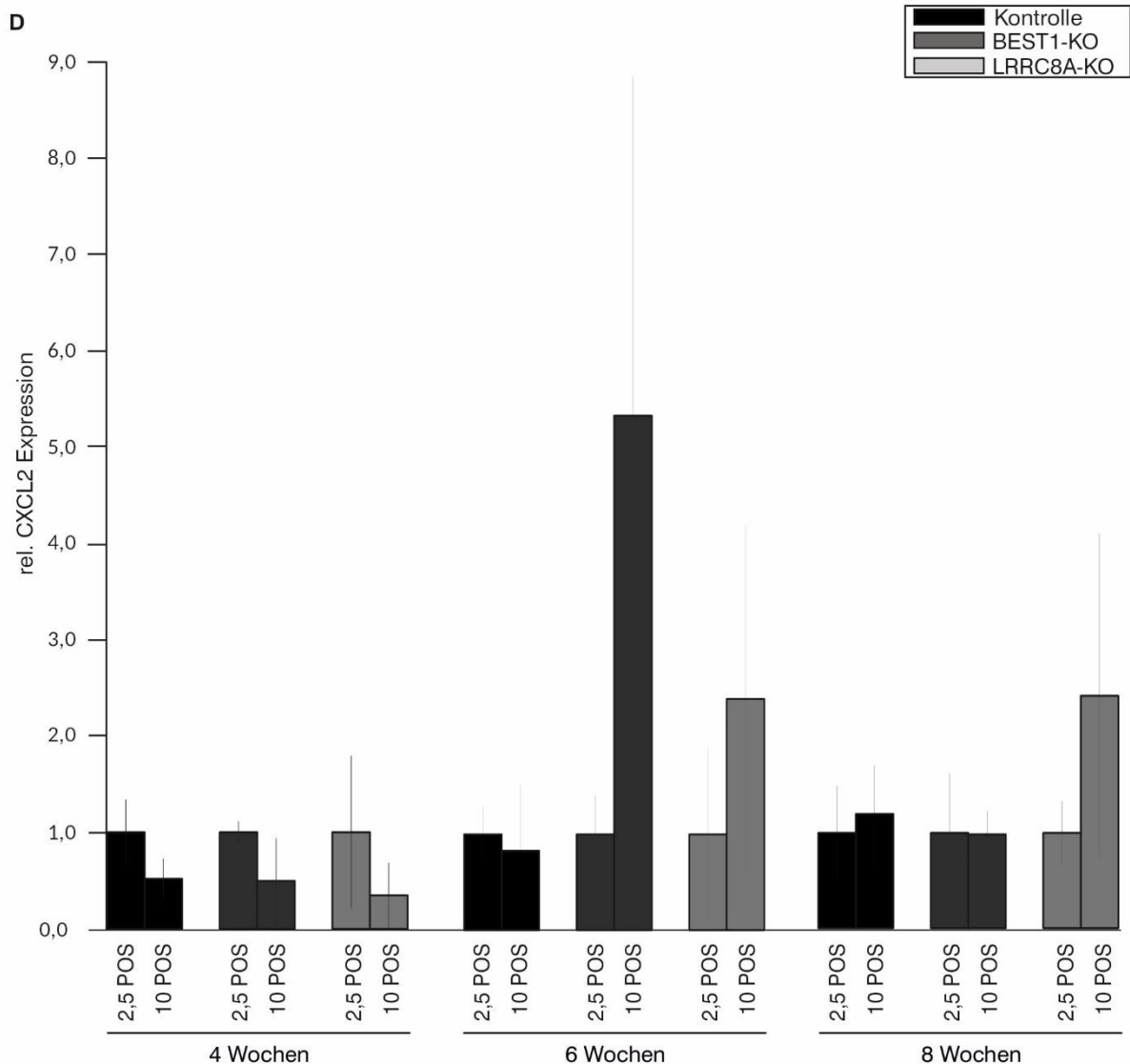


Abbildung 9: CXCL2 mRNA-Expression in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Zugabe von POS.

hiPSC-RPE Zellen wurden über 4, 6 bzw. 8 Wochen POS in den Konzentrationen 2,5 bzw. 10 POS/Zelle zugegeben. Aus einer Probe pro Zelllinie (n=2) wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert.

(A) mRNA-Expression von CXCL2 in hiPSC-RPE Zellen von Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien. Es wurden technische Triplikate gemessen und gegen das Haushaltsgen HPRT1 normalisiert.

(B) Die mRNA-Werte der CXCL2 Expression der Kontroll-, BEST1-KO bzw. LRRC8A-KO Zelllinien wurden gepoolt und auf die jeweilige 4 Wochen Probe relativiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Es ist kein Trend in der CXCL2 Expression abhängig von der Dauer der POS-Zugabe zu erkennen.

(C) Die mRNA-Werte der CXCL2 Expression wurden auf die jeweilige Kontroll-Probe relativiert. Es ist kein Trend abhängig vom Zelltyp zu erkennen.

(D) Die mRNA-Werte der CXCL2 Expression wurden auf die jeweilige 2,5 POS Probe relativiert. Es ist kein Trend abhängig von der zugegebenen POS-Konzentration zu erkennen.

Abbildung 9A zeigt die Mittelwerte der CXCL2 mRNA-Expression aus den technischen Triplikaten, normalisiert auf die HPRT1 mRNA-Expression. Zur klareren Darstellung wurden die Werte je nach Fragestellung gepoolt und relativiert. Aufgrund zu kleiner Stichprobengröße (n=2) konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

Sollte eine Veränderung der CXCL2 mRNA-Expression sichtbar werden, wäre zu erwarten, dass diese als Seneszenz-Marker im Verlauf der Zeit steigt. Um diesen Effekt zu beurteilen dient Abbildung 9B. In allen 2,5 POS Proben und der 10 POS Kontroll-Probe ist die CXCL2 mRNA-Expression zum frühen Messzeitpunkt am höchsten, nicht zum letzten. Auch die anderen Werte zeigen keinen klaren Aufwärtstrend der CXCL2 mRNA-Expression im Verlauf der Zeit.

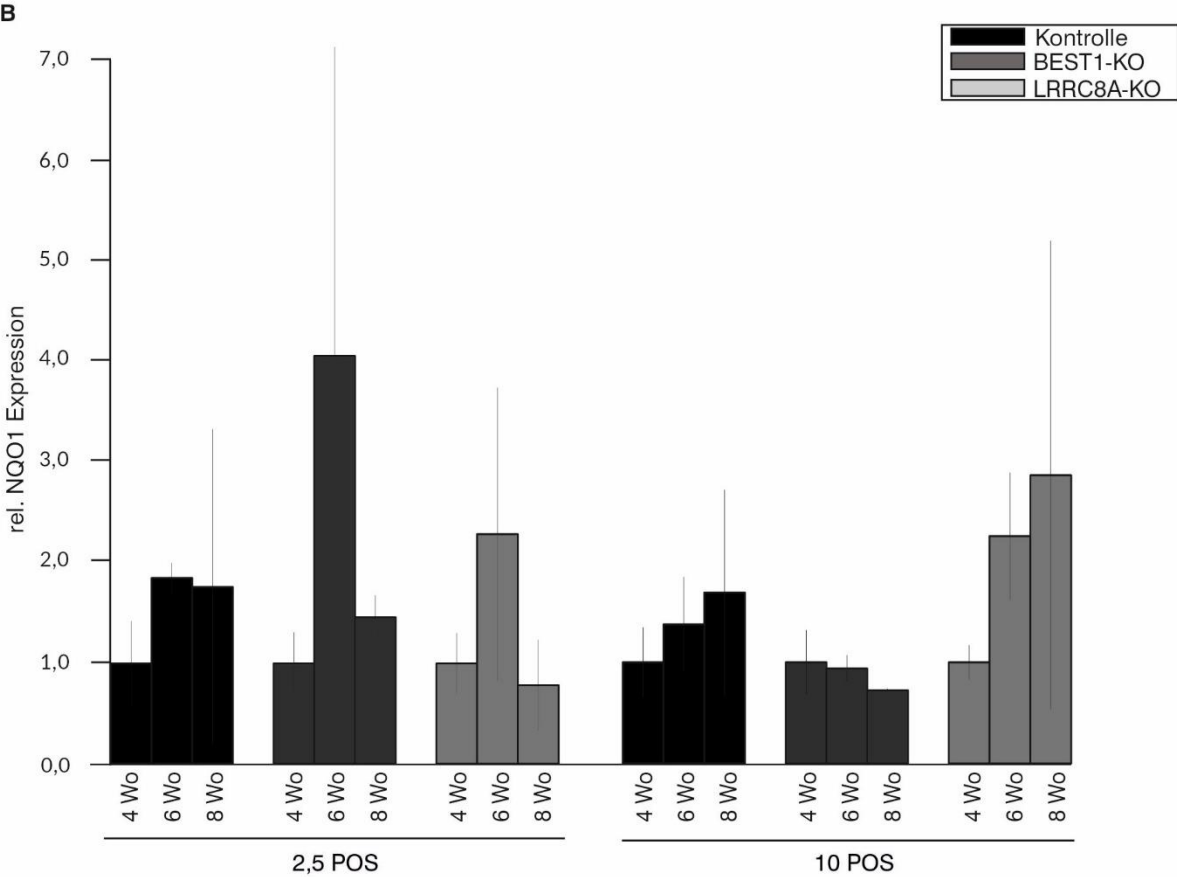
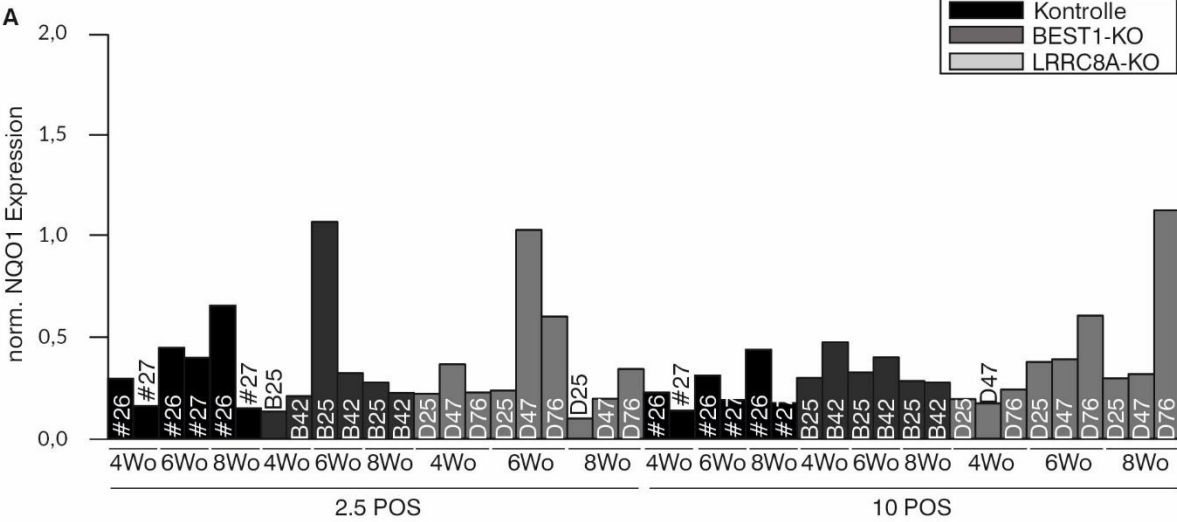
Die Zugabe von mehr POS sowie ein Knockout von BEST1 bzw. LRRC8A könnten die Zellalterung beschleunigen und somit eine höhere CXCL2 mRNA-Expression nach sich ziehen. Beim Vergleich der Zelltypen (Abbildung 9C) liegt jedoch in vier von sechs Gruppen die höchste CXCL2 mRNA-Expression in der Kontrolle vor. Auch zwischen BEST1- und LRRC8A-KO variiert es, welcher Wert höher ist. Bei der Betrachtung des Einflusses der POS-Konzentration (Abbildung 9D) zeigt sich ein ähnlich inkonsistentes Bild. Nach vier Wochen zeigt sich in allen Zellpopulationen bei der Zugabe von mehr POS eine niedrigere CXCL2 mRNA-Expression. Ebenso in der 6 Wochen Kontrolle und im acht Wochen BEST1-KO. Somit ist in fünf Gruppen ein Absinken und in vier Gruppen eine Steigerung der CXCL2 mRNA-Expression durch Zugabe von mehr POS zu sehen.

Bei der Analyse der CXCL2 mRNA-Expression im Langzeitverlauf zeigen die hiPSC-RPE Zellen keinen Anstieg des Seneszenzmarkers. Auch ein Einfluss der POS-Zugabe oder des BEST1- bzw. LRRC8A-KO konnte nicht gezeigt werden.

4.1.2.3 NQO1 als Stressmarker

Das RPE ist durch vielfältige Faktoren in besonderer Weise oxidativem Stress ausgesetzt. Dies kann durch den daraus folgenden Zelluntergang zur Progression von degenerativen Prozessen beitragen. Zur Zytoprotektion werden bei erhöhtem

oxidativem Stress verschiedene Signalwege aktiviert und es kommt zur erhöhten Expression von antioxidativen Spezies, unter anderem von NQO1 (52).



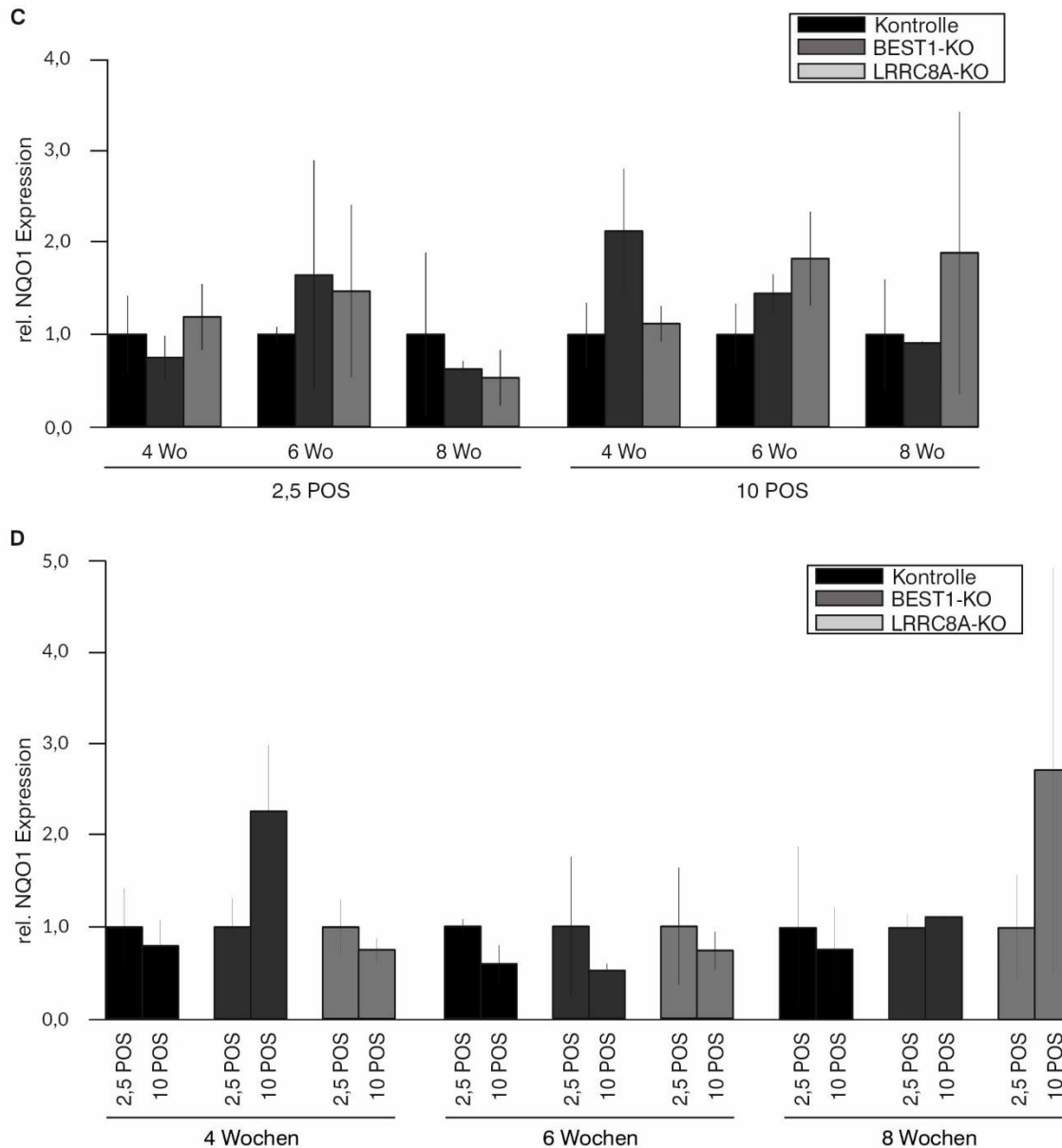


Abbildung 10: NQO1 mRNA-Expression in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Zugabe von POS.

hiPSC-RPE Zellen wurden über 4, 6 bzw. 8 Wochen POS in den Konzentrationen 2,5 bzw. 10 POS/Zelle zugegeben. Aus einer Probe pro Zelllinie (n=2) wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert.

(A) mRNA-Expression von NQO1 in hiPSC-RPE Zellen von Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien. Es wurden technische Triplikate gemessen und gegen das Haushaltsgen HPRT1 normalisiert.

(B) Die mRNA-Werte der NQO1 Expression der Kontroll-, BEST1-KO bzw. LRRC8A-KO Zelllinien wurden gepoolt und auf die jeweilige 4 Wochen Probe relativiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Es ist kein Trend in der NQO1 Expression abhängig von der Dauer der POS-Zugabe zu erkennen.

(C) Die mRNA-Werte der NQO1 Expression wurden auf die jeweilige Kontroll-Probe relativiert. Es ist kein Trend abhängig vom Zelltyp zu erkennen.

(D) Die mRNA-Werte der NQO1 Expression wurden auf die jeweilige 2,5 POS Probe relativiert. Es ist kein Trend abhängig von der zugegebenen POS-Konzentration zu erkennen.

Abbildung 10A zeigt die Mittelwerte der NQO1 mRNA-Expression aus den technischen Triplikaten, normalisiert auf die HPRT1 mRNA-Expression. Zur klareren Darstellung wurden die Werte je nach Fragestellung gepoolt und relativiert. Aufgrund zu kleiner Stichprobengröße (n=2) konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

Betrachtet man die Entwicklung der NQO1 mRNA-Expression im Verlauf der Zeit (Abbildung 10B) zeigt sich teilweise ein Abfallen (10 POS BEST1-KO), teilweise ein Anstieg (10 POS Kontrolle und LRRC8A-KO) und in den anderen Fällen kein Trend. Beim Vergleich der Zelltypen (Abbildung 10C) ist teils bei der Kontrolle (2,5 POS 8 Wochen), teils beim BEST1-KO (2,5 POS 6 Wochen, 10 POS 4 Wochen) und in den übrigen Fällen beim LRRC8A-KO die höchste NQO1 mRNA-Expression messbar. Durch die höhere POS-Konzentration (Abbildung 10D) wurde in drei Gruppen (4 Wochen BEST1-KO, 8 Wochen BEST1-KO und LRRC8A-KO) eine höhere NQO1 mRNA Expression gemessen, in den anderen sechs Gruppen eine niedrigere.

Bei der Analyse der NQO1 mRNA-Expression im Langzeitverlauf zeigen die hiPSC-RPE Zellen keinen Hinweis auf erhöhten oxidativen Stress. Auch ein Einfluss der POS-Zugabe oder des BEST1- bzw. LRRC8A-KO wird nicht deutlich.

4.1.3 Analyse der POS-Degradation

Wie in 3.5 beschrieben wurden vier Kontroll-, vier BEST1-KO und zwei LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zelllinien in Duplikaten (n=4) über 7 bzw. 24 h mit 15 POS pro Zelle inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte 0 und 24 h nach Ende der Inkubation mittels Western Blot (siehe 3.10). Es sollte geprüft werden, ob Rhodopsin, als in POS enthaltenes Photopigment (34), bei vorliegendem BEST1-KO verzögert abgebaut wird, wie es für M. Best hiPSC-RPE beschrieben wurde (16, 35).

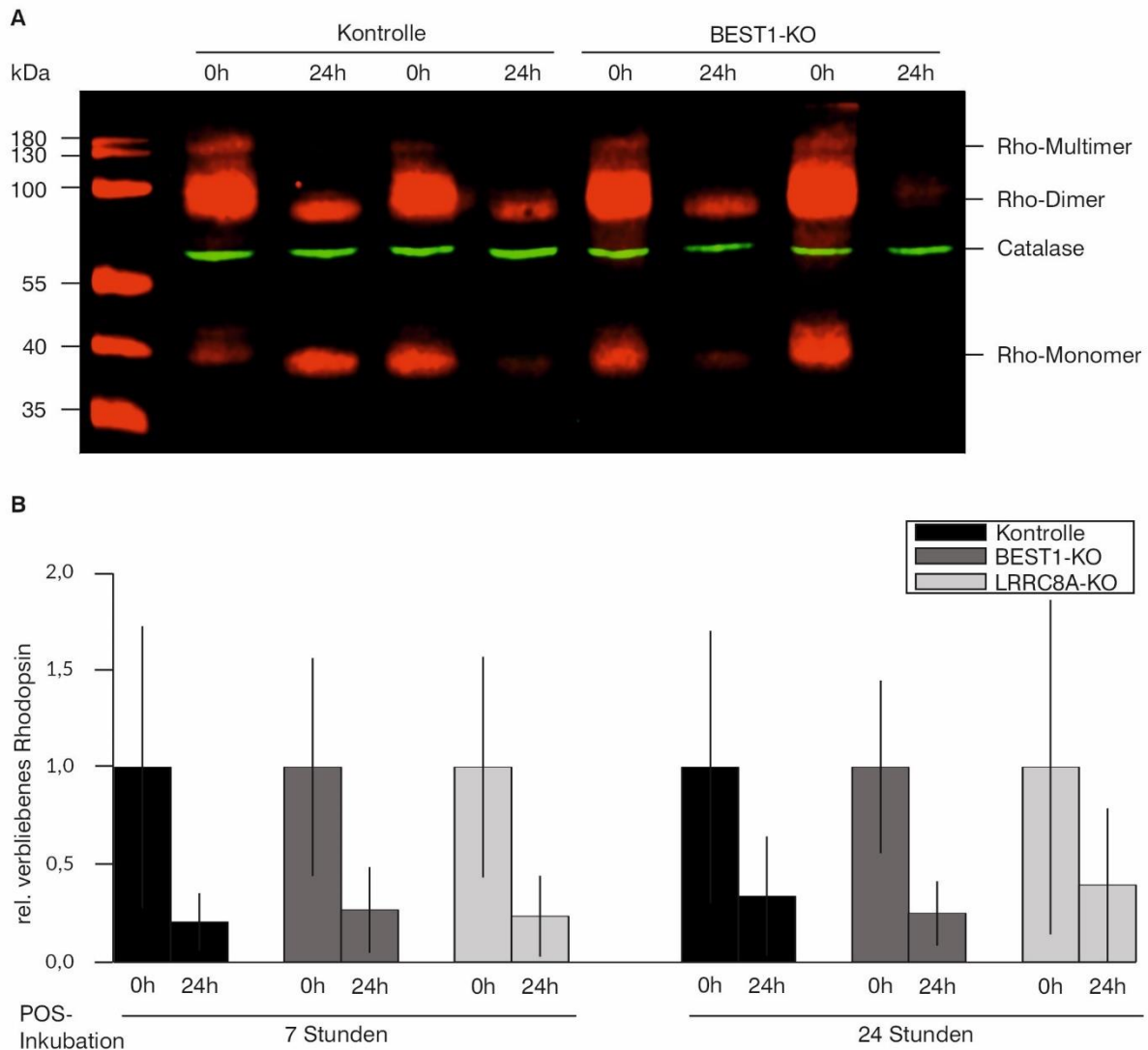


Abbildung 11: Verbleibende Rhodopsin-Menge in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Zugabe von POS.

Zehn unabhängigen hiPSC-RPE Zelllinien (4 Kontrolle, 4 BEST1-KO, 2 LRRC8A-KO) wurden POS für 7 bzw. 24 h zugegeben. Anschließend wurden die Zellen entweder sofort (Zeitpunkt 0 h) oder nach einer weiteren 24-stündigen Inkubationsperiode ohne POS (Zeitpunkt 24 h) für Zellysate geerntet.

(A) Repräsentativer Western Blot von Ganzzell-Lysaten zum Zeitpunkt 0 h bzw. 24 h nach einer 7- oder 24-stündigen Inkubation mit POS. Ein spezifischer Antikörper (Rho-1D4) gegen Rhodopsin (rot) wurde verwendet, um Monomere und komplezierte Formen von Rhodopsin nachzuweisen. Catalase (grün) wurde als Ladekontrolle verwendet. Aus zwei unabhängigen Proben wurden Ganzzell-Lysate (n=4) in technischen Triplikaten mittels Western Blot analysiert.

(B) Densitometrische Auswertung der gescannten Western Blots mittels Quantifizierung der Rhodopsin-Dimere und anschließender Normalisierung auf Catalase derselben Blots. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen im Verhältnis zur 0 h Probe. Zum 24 h Zeitpunkt ist kein Unterschied im Rhodopsin-Abbau zwischen Kontrolle und BEST1-KO bzw. LRRC8A-KO zu erkennen. Die statistische Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests zeigte keine Signifikanz.

Abbildung 11A zeigt einen repräsentativen Western Blot. In der ersten Spalte sind die Banden der PageRuler™ Prestained Protein Ladder zu erkennen. Die entsprechenden Proteinmassen in kDa sind links am Gelbild angegeben. Gefärbt wurde gegen Catalase (grün) als Ladekontrolle und Rhodopsin (rot). Es zeigen sich rote Signale bei ca. 40 kDa, 80 kDa und darüber. Das 40 kDa Signal entspricht Rhodopsin-Monomeren, das bei 80 kDa Dimeren, die darüber höheren Multimerformen. Die Bildung von Rhodopsin-Dimeren und Multimeren wurde bereits gezeigt (53, 54). Zur Quantifizierung wurde die Rhodopsin Expression der dimerisierten Form verwendet. Anschließend wurde gegen die Catalase Expression derselben Blots normalisiert und auf die 0 h Probe relativiert (Abbildung 11B).

In den Proben die sieben Stunden mit POS inkubiert wurden zeigte sich, dass Rhodopsin über einen Zeitraum von 24 Stunden in der Kontrolle zu 80 % ($0,2 \pm 0,15$) abgebaut wurde. Bei Vorliegen des BEST1-KO lag der Abbau bei 67 % ($0,27 \pm 0,22$), im LRRC8A-KO hiPSC-RPE bei 77 % ($0,23 \pm 0,21$). Diese Ergebnisse deuten an, dass die POS-Degradation durch fehlendes BEST1 eingeschränkt sein könnte, nicht jedoch durch einen LRRC8A-KO. Bei der Auswertung der Proben mit 24-stündiger POS-Inkubation ergaben sich folgende Werte: Kontrolle 66% ($0,34 \pm 0,31$), BEST1-KO 75 % ($0,25 \pm 0,17$) und LRRC8A-KO 61 % ($0,39 \pm 0,39$). Somit zeigt sich hier im BEST1-KO hiPSC-RPE ein effektiverer Rhodopsin-Abbau als in der Kontrolle, wohingegen er sich beim LRRC8A-KO vermindert darstellt. Die Ergebnisse zeigten keine Signifikanz.

Bei der Untersuchung der POS-Degradation in hiPSC-RPE Zellen konnte nicht bestätigt werden, dass es durch einen BEST1-KO zu einer Einschränkung beim Rhodopsin-Abbau kommt. Auch bei Vorliegen eines LRRC8A-KO wurde kein eindeutiger Effekt deutlich.

4.1.4 Analyse des lysosomalen pH-Wertes (pH_{Lys})

In M. Best hiPSC-RPE Zellen ist nach POS-Zugabe ein höherer pH_{Lys} als in der Kontrolle beschrieben worden (28). Um diesen Effekt auch im BEST1-KO Modell zu untersuchen wurden Kontroll-, BEST1-KO, LRRC8A-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellreihen wie in 3.5 beschrieben behandelt und anschließend wie in 3.11 dargelegt analysiert.

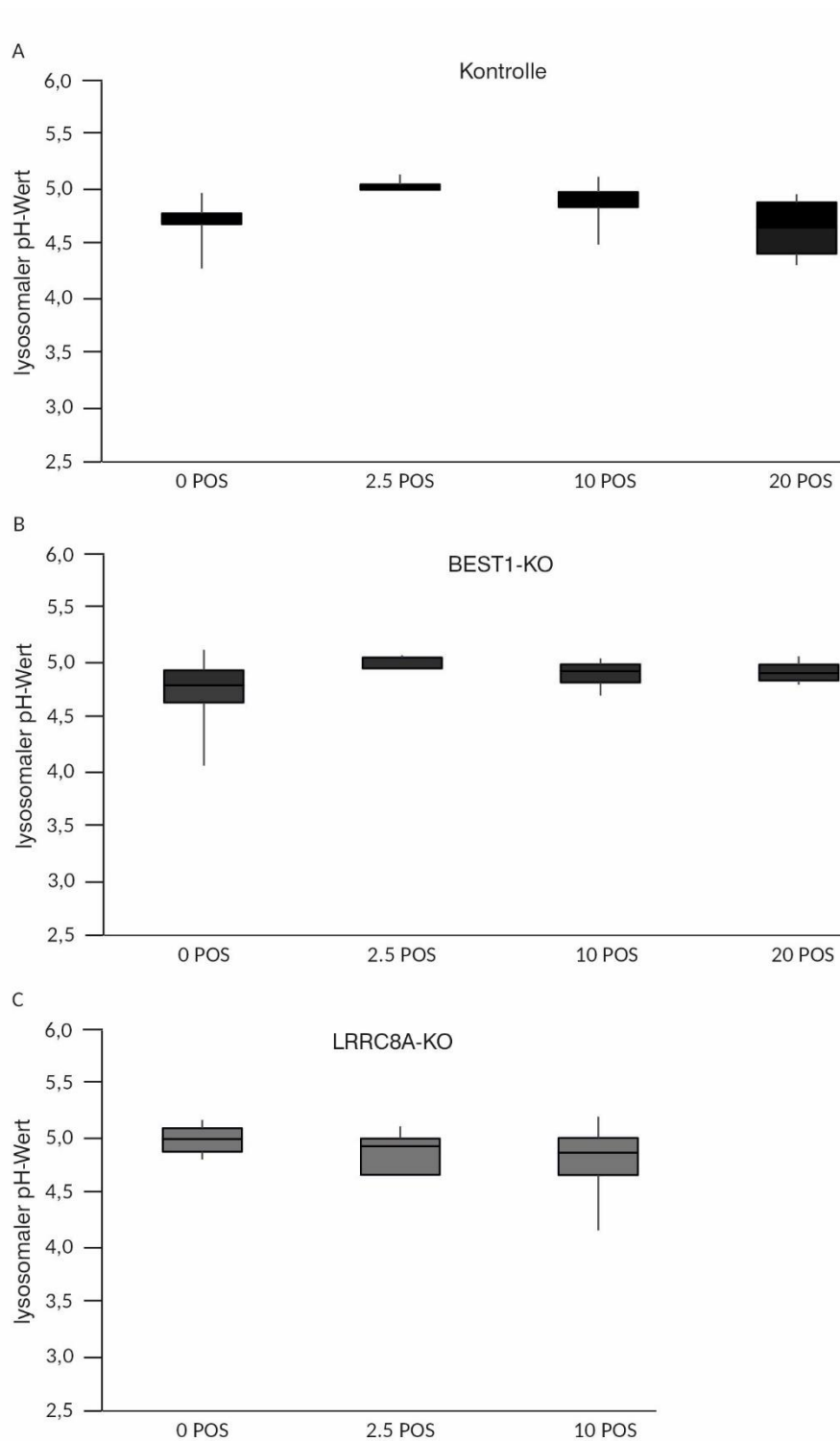


Abbildung 12: Lysosomaler pH-Wert in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe.

hiPSC-RPE Zellkulturen (4 Kontrolle, 4 BEST1-KO, 2 LRRC8A-KO) wurden fünfmal wöchentlich über einen Zeitraum von 7 Tagen POS in den Konzentrationen 0, 2,5, 10 bzw. 20 POS/Zelle zugegeben. Die Messung des pH_{Lys} erfolgte mittels LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160. Dargestellt sind die Mittelwerte der pH_{Lys} mit Standardabweichung (n=4). Die pH_{Lys} -Werte der Zelllinien sind vergleichbar. Weder in der Kontrolle (**A**), noch im BEST1-KO (**B**) oder LRRC8A-KO (**C**) zeigt die POS-Zugabe einen signifikanten Effekt auf den pH_{Lys} .

Abbildung 12 zeigt den pH_{Lys} in Kontroll- (A), BEST1-KO (B) und LRRC8A-KO (C) hiPSC-RPE Zellen nach Zugabe von POS in den Konzentrationen 0, 2,5, 10 und 20 POS pro Zelle über eine Woche. Der pH_{Lys} der verschiedenen Zellreihen unterscheidet sich nach Kruskal-Wallis nicht signifikant voneinander.

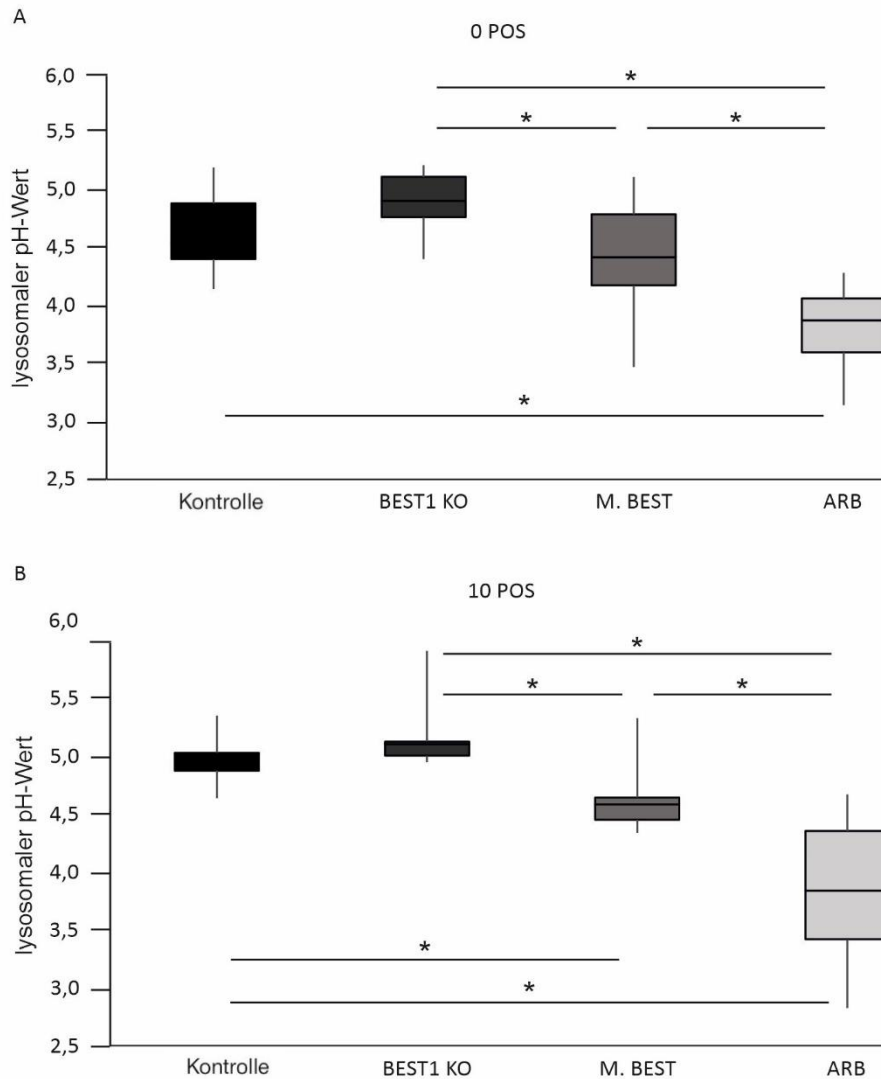
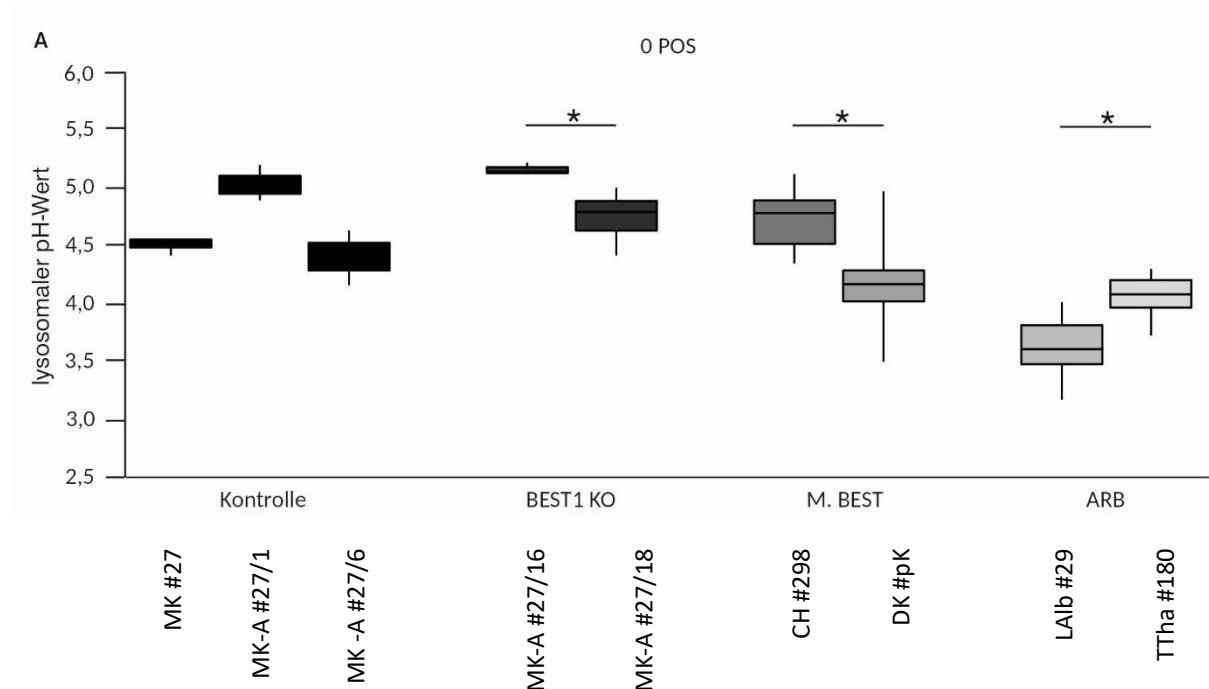


Abbildung 13: Lysosomaler pH-Wert in Kontroll-, BEST1-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe, kumulativ.

hiPSC-RPE Zellkulturen (3 Kontrolle, 2 BEST1-KO, 2 M. Best, 2 ARB) wurden fünfmal wöchentlich über 14 Tage POS in den Konzentrationen 0 bzw. 10 POS/Zelle zugegeben. Die Messung des pH_{Lys} erfolgte mittels LysoSensor™ Yellow-Blue DND-160. Dargestellt sind die Mittelwerte der pH_{Lys} mit Standardabweichung (n=9). Die mit * markierten Werte zeigen Signifikanz mit $p < 0,05$. Die Ergebnisse mit 0 (A) und 10 POS/Zelle (B) präsentieren sich ähnlich. Der pH_{Lys} in der Kontrolle und im BEST-KO unterscheidet sich nicht signifikant. Im Vergleich ist er in den M. Best und deutlicher in den ARB Proben erniedrigt.

Abbildung 13 zeigt den pH_{Lys} in Kontroll-, BEST1-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach zweiwöchiger Zugabe von POS in den Konzentrationen 0 und 10 POS pro Zelle. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests. Abbildung 13A zeigt die Zellenreihen ohne POS-Zugabe im Vergleich. Die Kontrolle und der BEST1-KO zeigen keinen signifikanten Unterschied im pH_{Lys} . Die M. Best Zellen weisen einen niedrigeren pH_{Lys} auf als der BEST1-KO; es deutet sich eine Erniedrigung gegenüber der Kontrolle an, diese ist jedoch nicht signifikant. Die ARB Linien zeigen einen signifikant niedrigeren pH_{Lys} als die anderen Zellreihen. Abbildung 13B zeigt die Ergebnisse nach der Zugabe von 10 POS pro Zelle. Die Ergebnisse stellen sich ähnlich dar wie ohne POS-Zugabe. Lediglich eine zusätzliche Signifikanz in der Erniedrigung im M. Best im Vergleich zur Kontrolle konnte festgestellt werden.

Während der Auswertung der Daten aus Abbildung 13 fielen deutliche Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Zellreihen innerhalb derselben Subgruppe auf. Zur Veranschaulichung wurde daher in Abbildung 14 der pH_{Lys} der einzelnen Zellreihen dargestellt.



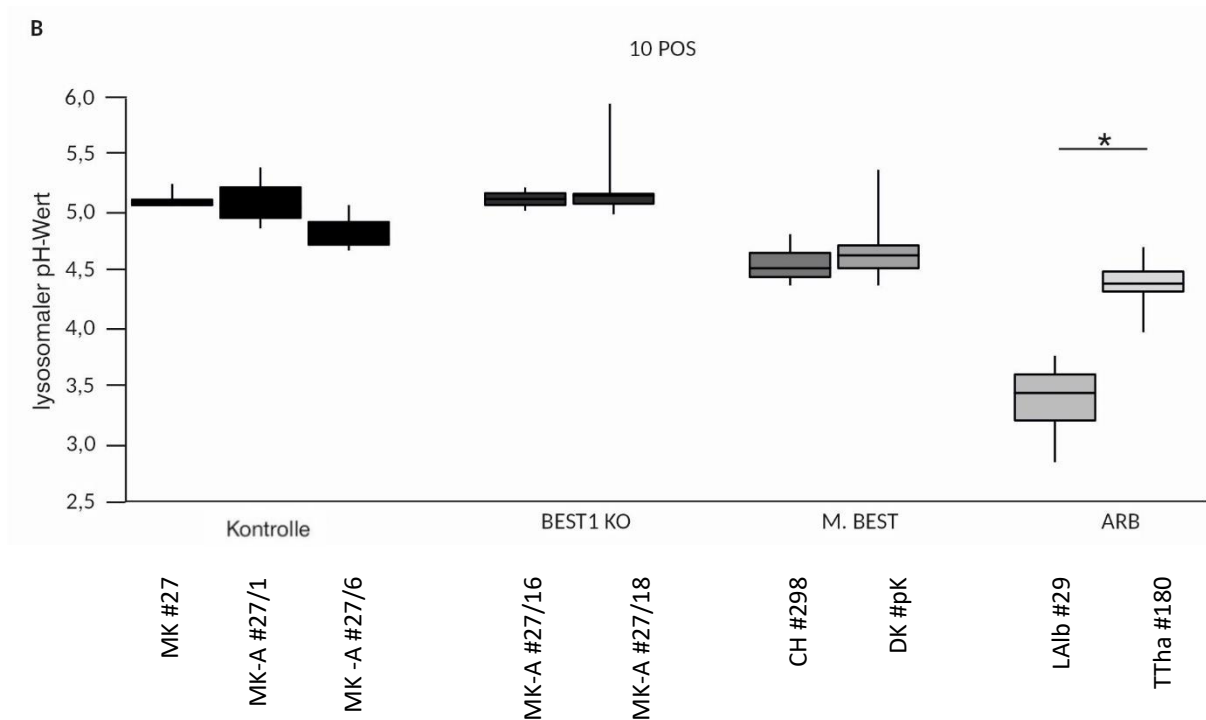


Abbildung 14: Lysosomaler pH-Wert in Kontroll-, BEST1-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe, getrennt nach Zelllinie.

Dargestellt sind die Werte aus Abbildung 13 jedoch getrennt nach den Zelllinien. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3). Die mit * markierten Werte zeigen Signifikanz mit $p < 0,05$. **(A)** Ohne POS-Zugabe. Die verwendeten BEST1-KO-, M. Best- und ARB-Zelllinien unterscheiden sich signifikant voneinander.

(B) Zugabe von 10 POS/Zelle. Nur die ARB-Zelllinien zeigt einen signifikanten Unterschied im pH_{Lys} .

Die Kontroll- (MK #27, MK-A #1, MK-A #6) und BEST1-KO Zelllinien (MK-A #16, MK-A #18) stammen vom selben Spender und die KO-Klone wurden mit derselben sgRNA erzeugt. Die M. Best (CH #298, DK #pK) und ARB Zelllinien (LAlb #29, TTha #180) stammen von verschiedenen Spender:innen und tragen unterschiedliche Mutationen. Besonders in den Proben ohne POS-Zugabe (Abbildung 14A) zeigen die Zellreihen Unterschiede mit Signifikanz von $p < 0,05$ im BEST1-KO, M. Best und ARB. Nach der Zugabe von 10 POS pro Zelle (Abbildung 14B) ist der Effekt weniger deutlich, mit einer Signifikanz nur zwischen den ARB Proben.

In den durchgeführten Versuchen konnte die durch Nachtigal et al. beschriebene eingeschränkte lysosomale Azidifizierung in M. Best hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe (28) nicht repliziert werden. In keiner der hier verwendeten Zellreihen konnte eine Erniedrigung des pH_{Lys} nach POS-Zugabe gezeigt werden. Sowohl ohne als auch mit POS-Zugabe zeigen die M. Best und ARB Zelllinien zudem eher niedrigere pH_{Lys} -

Werte als die Kontrolle. Im BEST1-KO und LRRC8A-KO zeigen sich keine Unterschiede zur Kontrolle. Die Zellreihen der einzelnen Subgruppen unterscheiden sich zum Teil signifikant voneinander. Dies lässt sich nicht nur bei Proben mit unterschiedlichen Mutationen beobachten, sondern auch im KO-Modell zwischen Klonen desselben Spenders unter Verwendung derselben sgRNA.

4.2 Untersuchungen zur Wirkstoffbehandlung mit Curcumin Light (CCL)

Für CC ergab sich neben Hinweisen auf antioxidative, antikanzerogene, antiinflammatorische sowie neuroprotektive Eigenschaften (39) auch eine potentielle Rolle in der Behandlung von retinalen Erkrankungen (40). Frühere Arbeiten zeigten bereits einen Einfluss auf die Expression verschiedener Proteine (42). Da die Bestrophinopathien eine mutationsabhängig reduzierte BEST1 Expression zeigen (2, 28), sollte in den folgenden Versuchen die Wirkung von CC in M. Best und ARB hiPSC-RPE untersucht werden.

CC weist eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit auf, sodass zur Anpassung der Pharmakokinetik verschiedene Modifikationen getestet werden (41). In ihrer Arbeit zum Einfluss von CC auf M. Best hiPSC-RPE verwendeten Lin et al. neben CC CC-Nanopartikel. In ihren Versuchen zeigten sie dadurch eine verstärkte Expression von BEST1 auf mRNA- und Proteinebene (30). In dieser Arbeit wurde als CC-Modifikation CCL verwendet, ein Wirkstoff der bei unverändertem Wirkmechanismus eine erhöhte Stabilität aufzuweisen scheint.

Zur Untersuchung der Wirkung von CCL auf M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen wurden diese wie in 3.7 beschrieben behandelt. Zur Analyse wurden qRT-PCRs (3.9), Western Blots (3.10) und ICCs (3.8) durchgeführt, um die BEST1 mRNA- und Proteinexpression sowie Lokalisation zu beurteilen.

4.2.1 Effekt von CC und CCL auf die BEST1 Expression und Lokalisation in hiPSC-RPE Zellen

Im ersten Versuchsansatz sollten die Expression von BEST1 mRNA und Protein sowie die Lokalisation von BEST1 nach Zugabe von 20 μ M CC bzw. CCL in hiPSC-RPE

Zellen einer ARB Zelllinie (N99K/R141H) untersucht werden. Dabei wurde insbesondere der Effekt unterschiedlicher Behandlungsdauern (7, 30 und 80 h) geprüft. DMSO diente als Kontrolle. Für jede Behandlungsdauer wurden drei unabhängige Versuche mit zwei verschiedenen Klonen (LAlb #29, #33) durchgeführt (n = 6).

Zur Untersuchung der BEST1 mRNA-Expression wurden qRT-PCRs wie in 3.9 dargestellt durchgeführt.

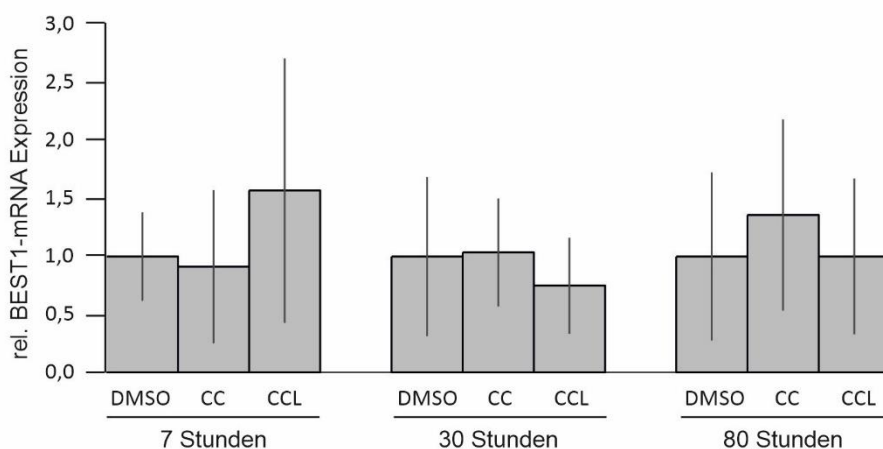


Abbildung 15: Relative BEST1 mRNA-Expression in ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.

ARB hiPSC-RPE Zellen (N99K/R141H) wurden über 7, 30 bzw. 80 h mit 20 μ M CC bzw. CCL behandelt. Aus sechs unabhängigen Proben (n=6) wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Es wurden technische Triplikate gemessen und gegen das Haushaltsgen HPRT1 normalisiert. Die Werte wurden gepoolt und auf die mit DMSO behandelte Probe als Kontrolle relativiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Es ist keine Steigerung der BEST1 mRNA-Expression nach der Behandlung mit CC oder CCL zu erkennen. Die statistische Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests zeigt keine Signifikanz.

Abbildung 15 zeigt die Auswertung der qRT-PCRs nach Behandlung der ARB hiPSC-RPE Zellen mit 20 μ M CC bzw. CCL über 7, 30 oder 80 h. Nach 7 h wurde in den mit CCL behandelten Zellen eine höhere BEST1 mRNA-Expression gemessen als in der Kontrolle, wohingegen CC keinen Effekt zeigt (CC: $0,91 \pm 0,66$, CCL: $1,57 \pm 1,14$). In den 30 h Proben konnte dieser Effekt jedoch nicht repliziert werden, die Expression ist sogar erniedrigt (CC: $1,03 \pm 0,47$, CCL: $0,75 \pm 0,41$). Nach 80 h Behandlungsdauer ist sie durch Zugabe von CC erhöht, nicht jedoch durch CCL (CC: $1,36 \pm 0,83$, CCL: $1,00 \pm 0,67$). Die statistische Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests zeigt keine Signifikanz. Somit präsentiert sich an dieser Stelle kein eindeutiger Effekt von CC oder

CCL auf die BEST1 mRNA-Expression in den untersuchten ARB hiPSC-RPE Zellen, unabhängig von der Behandlungsdauer.

Zur Analyse der Auswirkung von CCL auf die BEST1 Proteinexpression wurden hiPSC-RPE Zellen derselben Spenderin über 7 h mit Cycloheximid (CHX) und CCL behandelt. Der 30 und 80 h Ansatz erfolgten analog zur mRNA-Analyse ohne CHX. DMSO diente als Kontrolle. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot (3.10). Pro Behandlungsdauer wurden zwei verschiedene Klone untersucht (n=2).

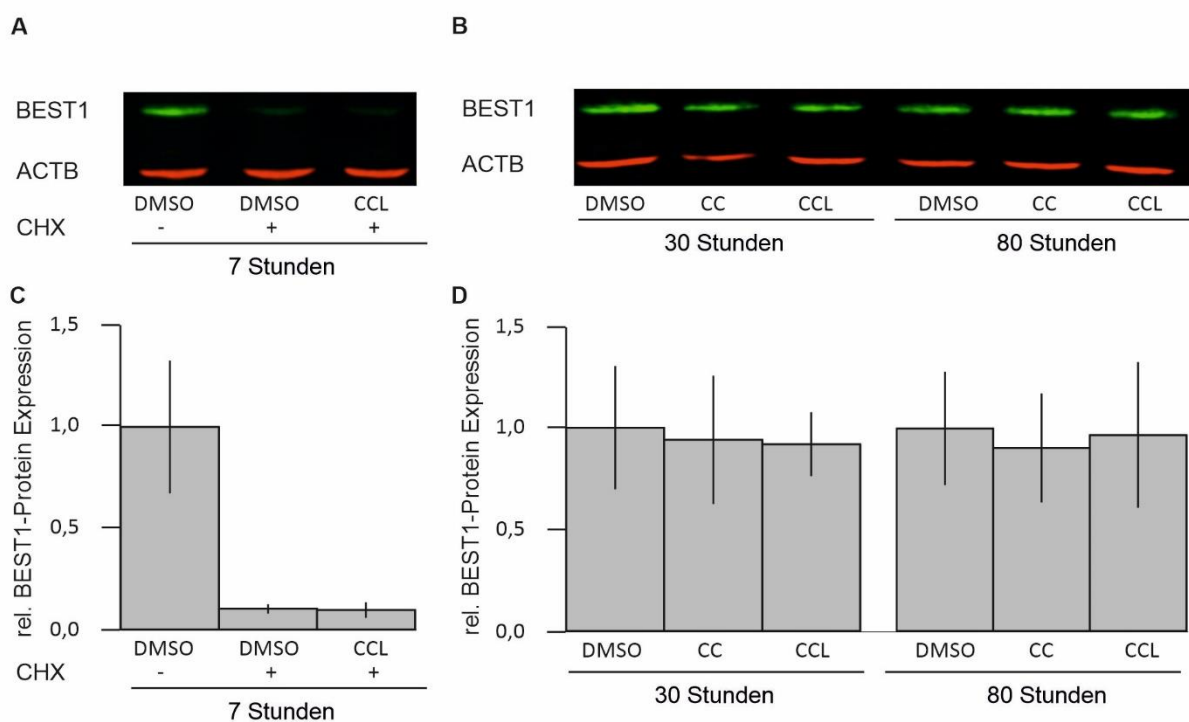


Abbildung 16: BEST1 Proteinexpression in ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.

(A) Repräsentativer Western Blot. ARB hiPSC-RPE Zellen (N99K/R141H) wurde für 7 h 20 μ M DMSO, DMSO+CHX bzw. DMSO+CHX+CCL zugegeben. Aus zwei unabhängigen Proben (n=2) wurden Ganzzell-Lysate in technischen Triplikaten mittels Western Blot analysiert. Gefärbt wurde gegen BEST1 (grün) und ACTB (rot).

(B) Repräsentativer Western Blot. Den gleichen Zellen wurde für 30 bzw. 80h 20 μ M DMSO, CC bzw. CCL zugegeben. Aus zwei unabhängigen Proben (n=2) wurden Ganzzell-Lysate in technischen Triplikaten mittels Western Blot analysiert. Gefärbt wurde gegen BEST1 (grün) und ACTB (rot).

(C)+(D) Densiometrische Auswertung der gescannten Western Blots mittels Quantifizierung von BEST1 und anschließender Normalisierung auf ACTB derselben Blots. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung im Verhältnis zur DMSO Probe. Es ist kein Anstieg der BEST1 Proteinexpression nach der Behandlung mit CC oder CCL zu erkennen. Die statistische Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests zeigt keine Signifikanz.

Um den Effekt von CCL auf die BEST1 Proteinexpression in ARB hiPSC-RPE Zellen zu untersuchen wurde die Zelllinie N99K/R141H für 7 h mit 20 μ M CCL in DMSO behandelt. Frühere Studien haben gezeigt, dass mutantes BEST1 nach 7 h vollständig degradiert ist, während wildtypisches BEST1 bis zu 24 h nach Proteinarrrest eine stabile Expression zeigte (22). Um zu prüfen, ob CCL eine stabilisierende Wirkung auf das mutante BEST1 hat, wurde die Proteinexpression mit CHX unterbrochen. Bei der densitometrischen Auswertung der Western Blots (Abbildung 16A und C) wurde keine Verbesserung der BEST1 Proteinexpression durch die Inkubation mit CCL bei gleichzeitigem Proteinstopp deutlich (CHX $0,1\pm 0,02$, CHX+CCL $0,1\pm 0,04$).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden hiPSC-RPE Zellen derselben Zelllinie über 30 bzw. 80 h mit 20 μ M CC bzw. CCL ohne CHX inkubiert (Abbildung 16B und D). Auch in diesem Versuch mit längerer Inkubationszeit und ohne Proteinarrrest ist kein Anstieg der BEST1 Proteinexpression zu messen (30 h: CC $0,94\pm 0,32$, CCL $0,92\pm 0,16$; 80 h: CC $0,9\pm 0,27$, CCL $0,97\pm 0,36$).

Um zu prüfen, ob CC oder CCL einen Einfluss auf die BEST1 Lokalisation hat, wurden zusätzlich kleine Stücke aus den Filtern, die zur mRNA-Analyse verwendet wurden, wie in 3.8 beschrieben zur immunozytochemischen Betrachtung präpariert.

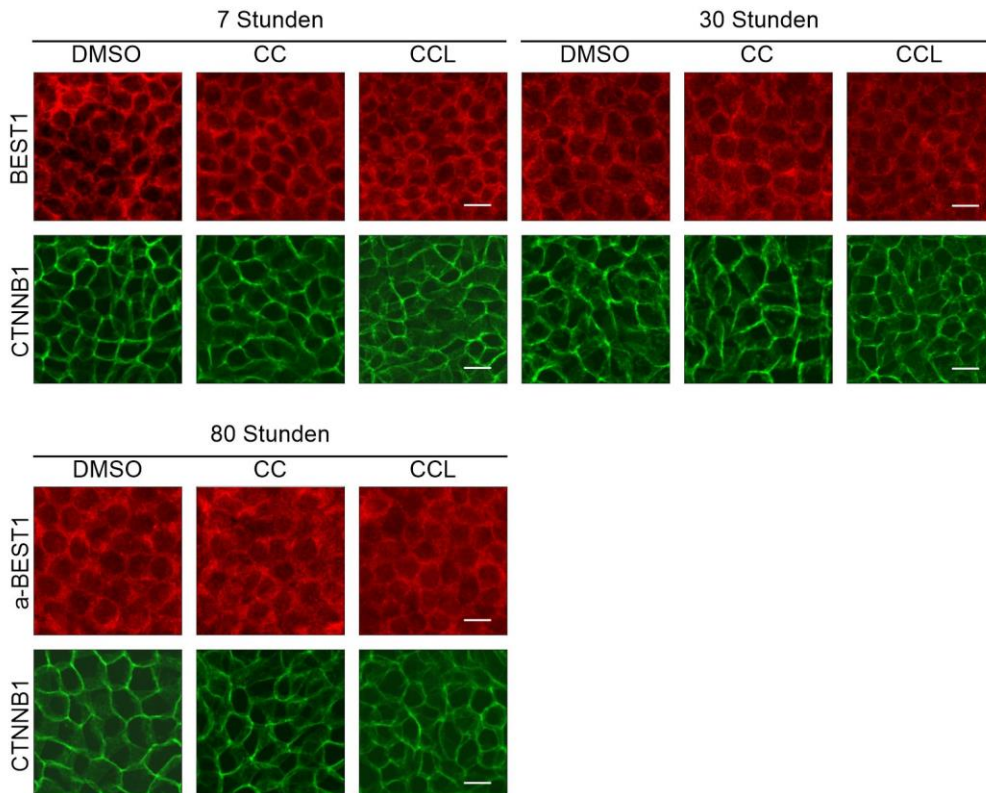


Abbildung 17: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation und Expression von BEST1 in ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.

ARB hiPSC-RPE Zellen (N99K/R141H) wurden über 7, 30 bzw. 80 h mit 20 μ M CC bzw. CCL behandelt. DMSO diente als Kontrolle. Aus sechs unabhängigen Proben (n=6) wurden Transwell-Filter gegen BEST1 (rot) und CTNNB1 (grün) gefärbt. Maßstabsleiste: 10 μ m. Es ist keine Verbesserung der BEST1 Lokalisation oder Expression nach der Behandlung mit CC bzw. CCL zu erkennen.

Abbildung 17 zeigt die konfokalen Immunfluoreszenz-Abbildungen. BEST1 wurde rot angefärbt und CTNNB1 grün. Die behandelten Zellen zeigen keine höhere BEST1 Proteinexpression und keine Verbesserung der membranständigen Lokalisation. Dies gilt für alle der drei getesteten Behandlungsdauern.

hiPSC-RPE Zellen der ARB Zelllinie N99K/R141H wurden über 7, 30 bzw. 80 h mit 20 μ M CC bzw. CCL behandelt. Hierbei konnte keine höhere BEST1 mRNA- oder Proteinexpression sowie keine Verbesserung der Lokalisation gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

4.2.2 Analyse verschiedener M. Best und ARB Zelllinien

In einem weiteren Versuchsansatz wurden hiPSC-RPE Zellen der Zelllinien +/I295del (M. Best), +/Q238R (M. Best), N99K/R141H (ARB) und A195V/L197PX26 (ARB) über 30 h mit 30 μ M CC bzw. CCL behandelt. DMSO diente als Kontrolle. Zur Untersuchung der BEST1 mRNA-Expression wurden qRT-PCRs wie in 3.9 dargestellt durchgeführt. Hierzu wurden drei unabhängige Proben pro Zelllinie gewonnen (n=3) und in technischen Triplikaten gemessen.

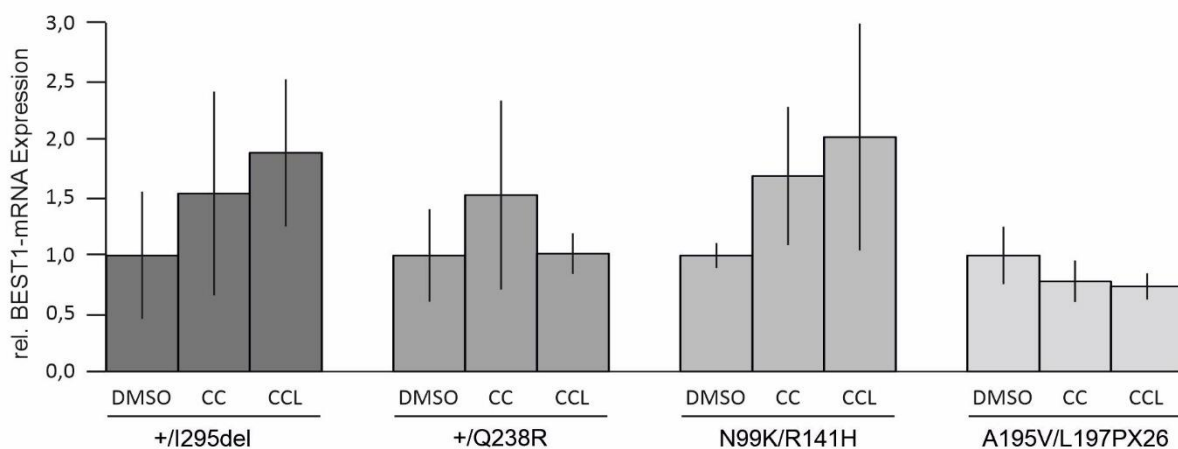


Abbildung 18: Relative BEST1 mRNA-Expression in M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.

Vier Zelllinien (M. Best: +/I295del, +/Q238R; ARB: N99K/R141H, A195V/L197PX26) wurden über 30 h mit 30 μ M CC bzw. CCL behandelt. Aus drei unabhängigen Proben (n=3) wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Es wurden technische Triplikate gemessen und gegen das Haushaltsgen HPRT1 normalisiert. Die Werte wurden gepoolt und auf die mit DMSO behandelte Probe als Kontrolle relativiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. In den Zelllinien +/I295del und N99K/R141H ist eine erhöhte BEST1 mRNA-Expression nach der Behandlung mit CC und besonders CCL zu erkennen. Die statistische Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests zeigt keine Signifikanz.

Abbildung 18 zeigt die Auswertung der qRT-PCRs. In den Zelllinien +/I295del (M. Best) und N99K/R141H (ARB) ist eine höhere BEST1 mRNA-Expression nach der Behandlung mit CC und eine stärker erhöhte BEST1 mRNA-Expression nach der Behandlung mit CCL zu erkennen (+/I295del: CC $1,53 \pm 0,88$, CCL $1,88 \pm 0,64$; N99K/R141H: CC $1,68 \pm 0,6$, CCL $2,02 \pm 0,98$). In der Zelllinie +/Q238R (M. Best) deutet sich eine Erhöhung nach der Behandlung mit CC an, nicht aber mit CCL (CC $1,52 \pm 0,81$, CCL $1,02 \pm 0,18$). In den A195V/L197PX26-Zellen (ARB) scheint die

Expression nach Behandlung zu sinken (CC $0,78\pm0,18$, CCL $0,73\pm0,11$). Die statistische Analyse mithilfe der Kruskal-Wallis Tests zeigt keine Signifikanz.

Analog wurden zwei Proben pro Zelllinie für die Analyse der BEST1 Proteinexpression gewonnen (3.10).

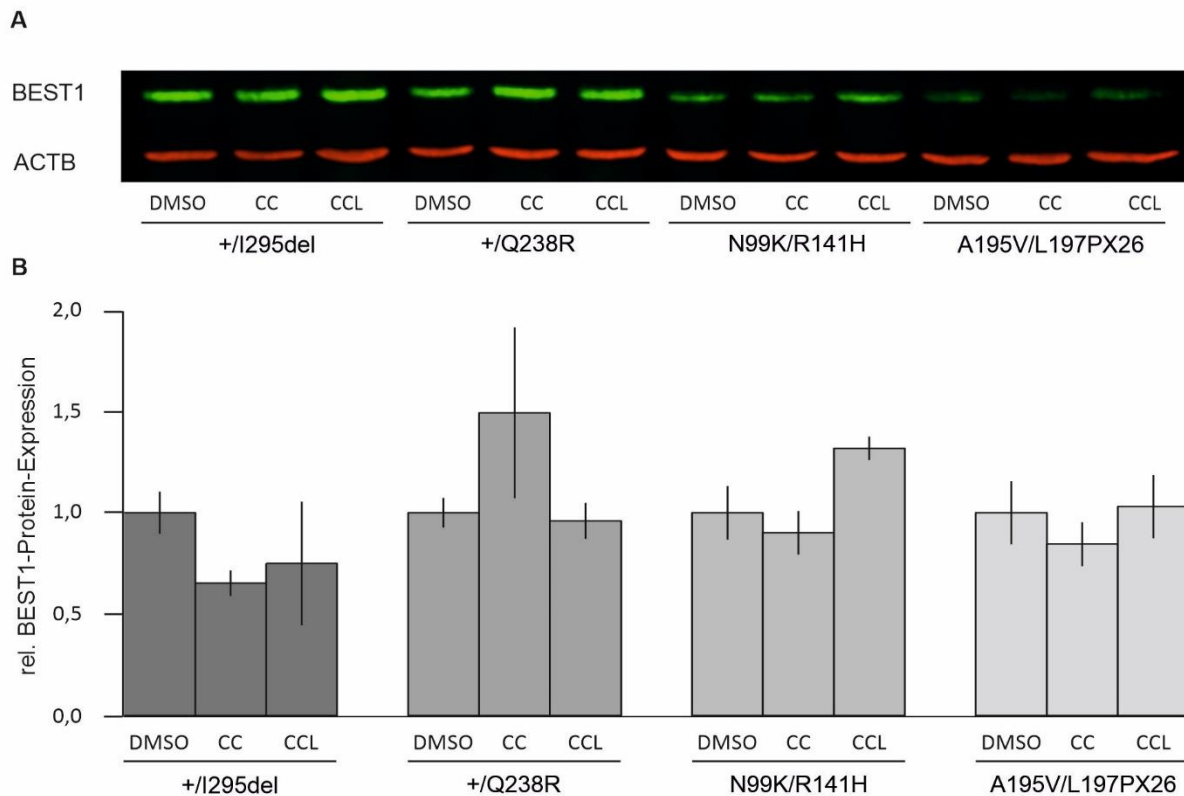


Abbildung 19: BEST1 Proteinexpression in M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.

Vier Zelllinien (M. Best: +/I295del, +/Q238R; ARB: N99K/R141H, A195V/L197PX26) wurden über 30 h mit 30 μ M CC bzw. CCL behandelt. DMSO diente als Kontrolle. Aus zwei unabhängigen Proben ($n=2$) wurden Ganzzell-Lysate in technischen Triplikaten mittels Western Blot analysiert.

(A) Repräsentativer Western Blot. Gefärbt wurde gegen BEST1 (grün) und ACTB (rot).

(B) Densitometrische Auswertung der gescannten Western Blots mittels Quantifizierung von BEST1 und anschließender Normalisierung auf ACTB derselben Blots. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung im Verhältnis zur jeweiligen DMSO Probe. Es ist kein Anstieg der BEST1 Proteinexpression nach der Behandlung mit CC oder CCL zu erkennen. Die statistische Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests zeigt keine Signifikanz.

In Abbildung 19 ist die Auswertung der BEST1 Proteinexpression in jeweils zwei M. Best und ARB Zelllinien nach 30-stündiger Inkubation mit CC bzw. CCL dargestellt. Es scheint eine Erhöhung der BEST1 Proteinexpression in den +/Q238R-Zellen (M. Best) nach der Zugabe von CC zu geben (CC $1,49\pm0,42$, CCL $0,96\pm0,09$) und in den N99K/R141H-Zellen (ARB) nach der Zugabe von CCL (CC $0,9\pm0,11$, CCL $1,32\pm0,06$).

Die anderen Bedingungen zeigen keinen Effekt oder eine tendenziell niedrigere Expression als die Kontrolle (+/I295del: CC $0,65 \pm 0,06$, CCL $0,75 \pm 0,3$; A195V/L197PX26: CC $0,84 \pm 0,11$, CCL $1,03 \pm 0,16$). Die statistische Analyse mithilfe der Kruskal-Wallis Tests zeigt keine Signifikanz.

Um zu prüfen ob CC oder CCL einen Einfluss auf die BEST1 Lokalisation hat wurden Schnitte aus den Filtern für die mRNA-Analyse gewonnen und wie in 3.8 beschrieben zur immunozytochemischen Betrachtung präpariert.

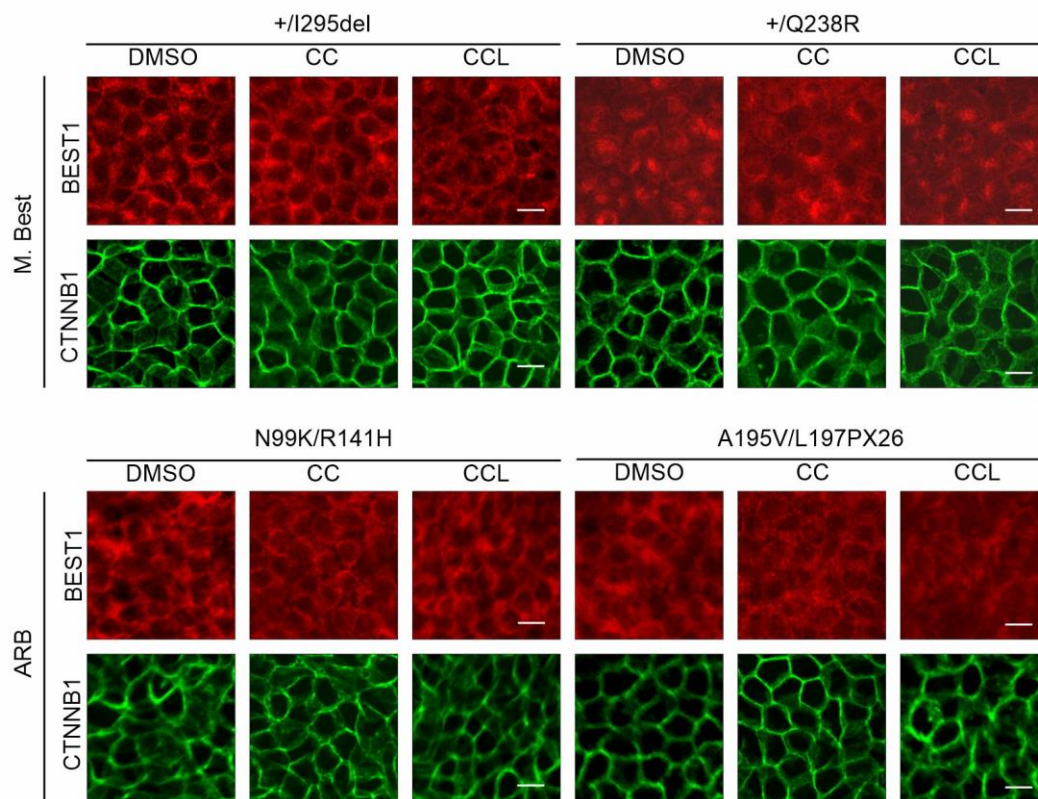


Abbildung 20: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildung zur Lokalisation und Expression von BEST1 in M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.

Vier Zelllinien (M. Best: +/I295del, +/Q238R; ARB: N99K/R141H, A195V/L197PX26) wurden über 30 h mit 30 μ M CC bzw. CCL behandelt. Aus drei unabhängigen Proben ($n=3$) wurden Transwell-Filter gegen BEST1 (rot) und CTNNB1 (grün) gefärbt. Maßstableiste: 10 μ m. Es ist keine Verbesserung der BEST1 Proteinexpression oder Lokalisation nach der Behandlung mit CC bzw. CCL zu erkennen.

hiPSC-RPE Zellen der Zelllinien +/I295del (M. Best), +/Q238R (M. Best), N99K/R141H (ARB) und A195V/L197PX26 (ARB) wurden über 30 h mit 30 μ M CC bzw. CCL behandelt. Abbildung 20 zeigt die konfokalen Immunfluoreszenz-Abbildungen. Bei den beiden M. Best Zelllinien liegt BEST1 insgesamt reduziert und vermehrt mislokalisiert intrazellulär vor. Dieser Effekt ist in +/Q238R stärker zu beobachten als in +/I295del. In den beiden ARB Zelllinien ist die BEST1 Proteinexpression reduziert, die

Lokalisation jedoch größtenteils regelrecht. Ein Effekt von CC oder CCL auf die BEST1 Proteinexpression oder Lokalisation ist in keiner der vier getesteten Zelllinien zu erkennen.

5. Diskussion

Bestrophinopathien sind Erkrankungen, deren Pathophysiologie bislang nicht vollständig verstanden ist und für die es aktuell noch keine Therapien gibt. Ziel dieser Arbeit war es daher, mithilfe eines Knockout Modells zum besseren Verständnis der zellphysiologischen Mechanismen bei *BEST1* Mutationen beizutragen sowie mit CCL ein mögliches Therapeutikum zu testen.

5.1 Auswirkungen von POS-Zugabe auf BEST1-KO hiPSC-RPE Zellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von BEST1-KO hiPSC-RPE Zellen POS zu verarbeiten betrachtet. Der Abbau von POS gehört zu den Hauptaufgaben des RPE und kann durch eine Vielzahl an Störungen beeinträchtigt werden (33, 34). Diese Funktion ist streng reguliert und setzt eine intakte Morphologie und Polarität sowie einen funktionierenden Vesikeltransport und ein stabiles Zytoskelett voraus. Dies alles sind Faktoren, die durch eine Volumenvergrößerung in den RPE-Zellen negativ beeinflusst werden könnten. Eine solche Beeinträchtigung der Phagozytose kann langfristig zur Akkumulation nicht abgebauten Materials führen. Auch für M. Best wurde in früheren Arbeiten eine gestörte POS-Degradation sowie eine Rhodopsin-Akkumulation und erhöhte Autofluoreszenz bei Langzeit POS-Zugabe gezeigt (16, 35). Diese Ergebnisse könnten in Einklang mit den pathognomonischen Fundusläsionen der Bestrophinopathien stehen.

HiPSC-RPE Zellen haben sich als adäquates Modell gezeigt, um Auswirkungen von *BEST1* Mutationen realitätsnah darzustellen (2, 16). In bisherigen Versuchen wurden Zellen von Mutationsträger:innen verwendet. Vorangegangene Publikationen mit BEST1-KO hiPSC-RPE haben sich nicht mit den Auswirkungen einer POS-Zugabe beschäftigt (55). Knockout-Modelle können bestimmte Effekte verstärken und andere als mutationsspezifisch enttarnen und somit zum pathophysiologischen Verständnis von Erkrankungen beitragen.

In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich keine erhöhte Autofluoreszenz oder Rhodopsin-Akkumulation im BEST1-KO nach Langzeit-Zugabe von POS. Auch der Nachweis einer verzögerten Rhodopsin-Degradation gelang nicht. Somit konnten die

Ergebnisse, die Singh et al. im M. Best hiPSC-RPE Modell aufgezeigt haben (16, 35), im BEST1-KO Modell nicht bestätigt werden.

Insbesondere die Auswertung der Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation nach Langzeit-Zugabe von POS zeigt jedoch Schwächen. Im Ergebnis-Teil dieser Arbeit sind beispielhaft die Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien nach 8-wöchiger Zugabe von POS in der Konzentration 10 POS pro Zelle dargestellt. Da dies die an dieser Stelle am längsten und meisten behandelten Proben sind, wäre unter diesen Konditionen ein möglicher Effekt auf die Autofluoreszenz und POS-Akkumulation am ehesten zu erwarten. Es zeigten sich jedoch folgende Faktoren, welche eine eindeutige Aussage und Quantifizierung erschweren: große Heterogenität in Menge und Verteilungsmuster innerhalb der gleichen Proben, starke Orts- und Ebenenabhängigkeit auf dem Transwell-Filter, teilweise Sichtbarkeit der Autofluoreszenz auch im grünen Spektrum. Eine Möglichkeit die heterogene Verteilung bei der Auswertung auszugleichen könnte sein, feste Koordinaten zu bestimmen, die bei jedem Filter verwendet werden. Hierbei würde aber nicht berücksichtigt, dass eine erhöhte Autofluoreszenz und Lipofuszin-Akkumulation ausschließlich in umschriebenen Läsionen aufzutreten scheint (56). Dies führt außerdem zu der Frage, ob die Anzahl oder Größe der Akkumulate quantifiziert werden sollte oder die Gesamt-Intensität pro Bildabschnitt. Ebenfalls müssten Unterbrechungen im Zellverbund miteinbezogen werden. In der Veröffentlichung von Singh et al. ist nicht beschrieben, ob ähnliche Faktoren vorlagen und wie genau die Quantifizierung durchgeführt wurde.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die nicht nachweisbar erhöhte Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation könnte in der Menge der zugegebenen POS liegen. In dieser Arbeit wurden maximal 15 POS pro Zelle zugegeben, während Singh et al. bis zu 50 POS pro Zelle verwendet haben. Da die Beschaffung und Isolierung der POS einen enormen Kostenfaktor und Zeitaufwand darstellen, konnten diese Bedingungen bei der großen Anzahl eingesetzter Zelllinien und Replikate nicht nachgebildet werden. Die Verwendung mehrerer Zelllinien wurde jedoch als relevant betrachtet, da enorme Schwankungen zwischen den Zelllinien bekannt sind. Zudem entspricht ein Umsatz von 15 POS pro Tag eher den physiologischen Bedingungen (34).

Zum anderen ist die Qualität der POS schwer zu beurteilen. Die Schweineaugen wurden von einer lokalen Schlachtereier zur Verfügung gestellt. Wie viel Zeit vom Schlachten bis zur Verarbeitung im Labor verging, kann nicht eindeutig bestimmt werden. Kommerziell erhältliche, synthetisch hergestellte POS-Ersatzpartikel wären zwar eine Alternative, sind jedoch in den für diese Experimente erforderlichen Mengen äußerst kostenintensiv.

Bei der Auswertung der Western Blots zur Analyse der POS-Degradation traten pro Probe mehrere Signale in unterschiedlicher Größe auf, da Rhodopsin in Form von Monomeren, Dimeren und Multimeren vorliegen kann. Dies erschwerte eine vergleichbare Quantifizierung. Auch ein Erhitzen der Lysate vor der Analyse zeigte in dieser Hinsicht keine Verbesserung.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Analysen der Drusen-, Seneszenz- und Stressmarker. APOE, CXCL2 und NQO1 zeigten im zeitlichen Verlauf keine signifikante Zunahme der mRNA-Expression, weder in Kontroll- noch in Knockout Zellen. Somit scheint es, als hätten das Alter und die POS-Zugabe keinen Einfluss auf die gewählten Marker. Diese Beobachtung kann als Chance betrachtet werden, dass Ergebnisse von Versuchen mit zehn Wochen alten Zellen mit denen von 15 Wochen alten Zellen verglichen werden können. Dennoch sind auch Einschränkungen der vorliegenden Daten zu berücksichtigen. Aufgrund der hohen zeitlichen und finanziellen Ressourcen die dieses Projekt erforderte, wurde auf eine Kontrolle ohne POS-Zugabe verzichtet und es wurden nur zwei unabhängige Proben pro Untersuchungspunkt ausgewertet. Eine Prüfung auf statistische Signifikanz war daher nicht möglich und die gemessenen Werte zeigten teilweise sehr hohe Standardabweichungen.

Es bleibt fraglich, ob die POS-Zugabe in hiPSC-RPE Zellkulturen ein adäquates Modell darstellt, um die Entstehung von Lipofuszin-Läsionen bei Bestrophinopathien eingehend zu untersuchen. Belastbare Ergebnisse mit statistischer Aussagekraft würden vermutlich einen sehr hohen Ressourceneinsatz erfordern.

5.2 Lysosomaler pH-Wert in BEST1-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen

Ein weiterer untersuchter Parameter in den BEST1-KO hiPSC-RPE Zellen war der pH_{Lys} , der als Marker für die lysosomale Integrität herangezogen wurde. Lysosomale Enzyme benötigen zur Aktivierung ein saures Milieu, weshalb der pH_{Lys} als funktioneller Marker für die Funktionsfähigkeit des lysosomalen Systems dient (36, 37). In äquivalenten Versuchen zeigten Nachtigal et al. eine gestörte lysosomale Homöostase in M. Best hiPSC-RPE bei regelrechter Funktion in den Kontroll- und ARB Zelllinien (28). Im vorliegenden Versuchsansatz könnte auch eine Volumenzunahme der Zellen infolge des Verlusts von BEST1 oder LRRC8A zur Dysregulation des pH_{Lys} beitragen und somit die lysosomale Funktion zusätzlich beeinträchtigen.

In den hier durchgeführten Versuchen zeigten sich keine Unterschiede im pH_{Lys} zwischen den Kontrollzellen und BEST1-KO bzw. LRRC8A-KO Zellen. Somit scheint die Abwesenheit von BEST1 keinen messbaren Einfluss auf den pH_{Lys} zu haben. Dies erklärt sich möglicherweise, wenn man die lysosomale Dysfunktion durch einen erhöhten lysosomalen Abbau von mutiertem BEST1 bei M. Best begründet (28). Jedoch fiel auch im M. Best, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Nachtigal et al., kein im Vergleich erhöhter pH_{Lys} nach POS-Zugabe auf; er war sogar signifikant niedriger. Nach diesem Modell wäre außerdem zu erwarten, dass der pH_{Lys} in den ARB Zelllinien aufgrund von vorwiegend proteosomalem Abbau von BEST1 (28) eher der Kontrolle und dem Knockout entspricht; er ist jedoch noch niedriger als im M. Best. In allen Zelllinien war der pH_{Lys} mit und ohne POS-Zugabe im physiologischen Bereich. Zur optimalen Funktion der lysosomalen Enzyme sollte es jedoch zu einer Azidifizierung nach POS-Zugabe kommen (36). Während die Ergebnisse von Nachtigal et al. dies widerspiegeln, konnte diese Arbeit den Effekt nicht reproduzieren.

Wie bereits in Kapitel 5.1 diskutiert, könnten mögliche Ursachen in der Qualität der POS und der Dauer sowie Dosis der POS-Zugabe liegen. Die Ergebnisse von Nachtigal et al. wurden jedoch am selben Institut unter weitgehend identischen Protokollbedingungen durchgeführt, was diese Faktoren als alleinige Erklärung unwahrscheinlich erscheinen lässt. Zudem zeigte sich eine ausgeprägte Variabilität

zwischen den verwendeten Zelllinien. Bei M. Best und ARB spielen möglicherweise mutationsspezifische Effekte eine Rolle. Allerdings wurden auch Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem BEST1-KO beobachtet, obwohl beide Zelllinien vom selben gesunden Spender stammen. Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, die Verlässlichkeit der POS-Präparation sowie des hiPSC-RPE Modells weiter zu optimieren.

5.3 CCL als Therapieoption

Für die Bestrophinopathien gibt es bisher keine wirksamen Therapieoptionen. CC besitzt neben einer antioxidativen Wirkung auch antikanzerogene, antiinflammatorische sowie neuroprotektive Eigenschaften (39). CC zeigt sowohl epigenetische Einflüsse als auch eine direkte Interaktion mit bestimmten Proteinen (42). Eine mögliche Rolle in der Behandlung retinaler Erkrankungen (30, 40) sowie spezifisch von M. Best (30) ist bereits Gegenstand der aktuellen Forschung. In einer Studie zur Wirkung von CC bei RP konnten neben einer vermehrten Expression von Rhodopsin auch positive Effekte auf die Lokalisation des Sehpigments beobachtet werden (45).

Diese Effekte könnte man sich möglicherweise auch bei den Bestrophinopathien zunutze machen. Frühere Arbeiten haben ergeben, dass bei BEST1 Mutationen sowohl eine reduzierte Expression (2, 28), als auch eine fehlerhafte Lokalisation (22, 32) des Proteins vorliegt, wobei das Ausmaß mutationsabhängig zu sein scheint. Eine Erhöhung der Expression von BEST1 auf mRNA- und Proteinebene durch Zugabe von CC bzw. CC-Nanopartikeln in einem M. Best hiPSC-RPE Zellmodell wurde bereits in einer früheren Arbeit gezeigt (30).

CC als stark lipophile Substanz ist in seiner Bioverfügbarkeit eingeschränkt, sodass zur Anpassung der Pharmakokinetik verschiedene Modifikationen getestet werden (41). In dieser Arbeit wurde CCL verwendet, ein im Arbeitskreis von Frau PD Dr. Amslinger von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg entwickeltes Derivat. Der Wirkmechanismus bleibt nach ersten unveröffentlichten Daten hierbei unverändert, jedoch sollten die vorgenommenen Modifikationen die

Stabilität des Wirkstoffes erhöhen, wodurch eventuelle therapeutische Effekte verstärkt werden könnten.

Um die Effektivität von CCL in der Behandlung von Bestrophinopathien zu prüfen wurden in dieser Arbeit je zwei verschiedene M. Best und ARB Zelllinien behandelt. In der Zelllinie +/I295del (M. Best) sowie der Zelllinie N99K/R141H (ARB) zeigte sich eine höhere BEST1 mRNA-Expression nach der Behandlung mit CC und eine stärker erhöhte BEST1 mRNA-Expression nach der Behandlung mit CCL. Dieser Trend war jedoch statistisch nicht signifikant und konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Die Zelllinie +/Q238R (M. Best) ließ auf mRNA- und Proteinebene eine höhere Expression nach der Behandlung mit CC vermuten, nicht aber mit CCL. Auch hier zeigte sich keine statistische Signifikanz. A195V/L197PX26 (ARB) zeigte keinen Trend.

Bei den beiden M. Best Zelllinien liegt BEST1 insgesamt reduziert und vermehrt mislokalisiert intrazellulär vor. Dieser Effekt ist in +/Q238R stärker zu beobachten als in +/I295del. Dass CCL einen möglichen Effekt auf +/I295del hat, nicht aber auf +/Q238R ließe sich dadurch erklären, dass es das korrekt lokalisierte Protein stabilisiert, jedoch mislokalisiertes BEST1 nicht vor dem frühzeitigen Abbau schützt. Folgt man dieser Argumentation, wäre durch Zugabe von CCL eine Verbesserung der membranständigen Lokalisation in den +/I295del hiPSC-RPE Zellen zu erwarten. Dies hat sich in den Immunfluoreszenz-Versuchen jedoch nicht bestätigt.

In den beiden ARB Zelllinien ist die BEST1 Proteinexpression stark reduziert, die Lokalisation jedoch größtenteils regelrecht. Eine Effektivität bei N99K/R141H könnte darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Zelllinie eine *missense* Mutation vorliegt, welche zu einer Instabilität des Proteins führt. Somit könnte CCL auch hier stabilisierend wirken. Bei der Zugabe von CCL in N99K/R141H hiPSC-RPE Zellen bei gleichzeitigem Proteinarrrest mittels CHX konnte jedoch keine höhere Expression gezeigt werden. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen stabilisierenden Effekt von CCL in dieser Zelllinie. A195V/L197PX26 weist eine *nonsense* Mutation auf, die zu einem verfrühten Stopcodon führt. Somit hat CCL hier keinen Angriffspunkt.

Eine mögliche Wirksamkeit von CCL könnte somit mutationsabhängig sein. Da jedoch in keiner der Analysen eine statistische Signifikanz erreicht wurde, bleibt der therapeutische Nutzen von CCL bei der Behandlung von Bestrophinopathien fraglich.

In dieser Arbeit wurden 20 bzw. 30 μM der getesteten Substanzen verwendet, da sich bei institutsinternen Vorversuchen ab einer Zugabe von 50 μM CC und CCL zytotoxische Effekte zeigten. Somit erscheint eine Dosis-Erhöhung als wenig vielversprechende Strategie zur Verbesserung der Wirksamkeit. Auch eine Verkürzung der Behandlungsintervalle dürfte kaum Vorteile bringen. Vorversuche am Institut und in der Fakultät für Chemie und Pharmazie ergaben eine Halbwertszeit von CCL von etwa 6 h. Die in dieser Studie gewählte zweimal tägliche Wirkstoffzugabe sollte somit ausreichen, um die Effekte von CCL adäquat zu erfassen.

Zusammenfassend weist die Behandlung von Bestrophinopathien mit CC und seinem Derivat CCL erhebliche Limitationen auf. Zukünftig sollte daher verstärkt die Entwicklung und Prüfung alternativer Therapieansätze in den Fokus rücken.

5.4 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit hat sich als Ziel gesetzt, mithilfe eines hiPSC-RPE Modells zum pathophysiologischen Verständnis der Bestrophinopathien beizutragen, sowie die Rolle von CCL in ihrer Behandlung zu beurteilen. Zu den bereits am Institut vorliegenden M.Best und ARB hiPSC-RPE Zelllinien wurden erstmalig auch BEST1-KO und LRRC8A-KO Zelllinien in die Untersuchungen einbezogen.

Im BEST1-KO hiPSC-RPE Modell konnte weder eine gesteigerte Autofluoreszenz noch eine beeinträchtigte Rhodopsin- oder POS-Degradation nachgewiesen werden. Auch die Analyse des pH_{Lys} ergab keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockout Zellen. Dennoch stellt dieses Modell ein vielversprechendes Werkzeug zur Erforschung der Rolle von BEST1 in der humanen Retina dar. Zukünftige Forschung könnte insbesondere die Auswirkungen eines BEST1-KO auf die Anionen-Kanalfunktion sowie die Volumen- und Calcium-Homöostase näher untersuchen.

Bei der Behandlung von M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen mit CCL zeigten sich keine eindeutigen therapeutischen Effekte, es deutete sich aber eine mögliche Mutationsabhängigkeit bei der Wirksamkeit der Substanz an. Angesichts des Fehlens etablierter Therapien für die Bestrophinopathien ist eine Fortsetzung der Forschung auf diesem Gebiet für die Betroffenen von wesentlicher Bedeutung. Dabei ist es essenziell, sowohl bei der Entwicklung medikamentöser Ansätze als auch bei der Anwendung von Gensatztherapien mutationsspezifische Unterschiede gezielt zu berücksichtigen.

7. Zusammenfassung

Das Bestrophin-1 (BEST1) Protein wird vom *BEST1* Gen kodiert und ist ein integrales Membranprotein, welches beim Menschen vorwiegend in der basolateralen Plasmamembran des retinalen Pigmentepithels (RPE) zu finden ist. Es wird als Kalzium-regulierter Chlorid-Kanal beschrieben, der aus fünf identischen BEST1-Untereinheiten zusammengesetzt ist. Neben Chlorid transportiert dieser Kanal weitere monovalente Ionen und spielt vermutlich eine Rolle im volumenregulierten Anionen-Strom. Mutationen im *BEST1* Gen können zu unterschiedlichen Phänotypen von Netzhaut-Erkrankungen führen, welche als Bestrophinopathien bezeichnet werden. Dazu zählen der Morbus Best (M. Best), die autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) sowie die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB). Ebenfalls mit Mutationen im BEST1 Gen in Verbindung gebracht wurden das autosomal dominante Mikrokornea- Zapfen-Stäbchen-Dystrophie- Katarakt- posteriores Staphylom-Syndrom (MRCS-Syndrom) sowie die autosomal dominante Retinitis Pigmentosa (RP). Klinisch präsentieren sich die Bestrophinopathien durch progressiven zentralen Visusverlust, einen reduzierten *light peak* im Elektrokulogramm sowie die zunehmende Akkumulation von Lipofuszin, welche in der Fundoskopie zu erkennen ist. Eine zugelassene Therapie gibt es bis heute nicht.

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe eines BEST1-Knockouts (BEST1-KO) in differenzierten RPE-Zellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) einen Beitrag zur Grundlagenforschung zu leisten sowie die potentielle therapeutische Wirksamkeit von Curcumin (CC) und Curcumin Light (CCL) bei den Bestrophinopathien zu untersuchen. Zusätzlich wurden hiPSC-RPE Zelllinien mit einem Knockout des *leucine-rich repeat-containing protein 8A* (LRRC8A-KO) in die Untersuchung einbezogen, um beobachtete Effekte spezifisch dem Verlust von BEST1 oder generellen Volumenregulationsmechanismen zuordnen zu können.

Bei der Analyse der Autofluoreszenz sowie der Akkumulation von Photorezeptor-Außensegmenten (POS) nach vier- bis achtwöchiger Zugabe von POS konnte kein klarer Trend nach Zelllinie, Dauer oder Konzentration der POS-Zugabe gezeigt werden. Eine eindeutige Aussage war aufgrund komplexer Analysebedingungen nicht

zu treffen. Im selben Versuchsansatz wurden mittels qRT-PCR Marker für Drusenbildung, Seneszenz und Stress in den behandelten hiPSC-RPE Zellen untersucht. Auch hierbei konnte kein klarer Trend gezeigt werden. In einem weiteren Experiment wurden Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zelllinien über 7 und 24 h mit POS inkubiert und der Rhodopsin-Abbau analysiert. Hierbei konnte die in M. Best hiPSC-RPE beschriebene Einschränkung beim Rhodopsin-Abbau im BEST1-KO nicht bestätigt werden. Auch bei Vorliegen eines LRRC8A-KO wurde kein eindeutiger Effekt deutlich.

Darüber hinaus wurde in Kontroll-, BEST1-KO, LRRC8A-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellreihen der lysosomale pH (pH_{Lys}) nach zweiwöchiger POS-Zugabe analysiert. Die in der Literatur beschriebene verminderte lysosomale Azidifizierung in M. Best hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe konnte nicht reproduziert werden. In keiner der verwendeten Zellreihen konnte eine Erniedrigung des pH_{Lys} nach POS-Zugabe beobachtet werden. Sowohl unter Basalbedingungen als auch mit POS-Zugabe zeigten die M. Best und ARB Zelllinien zudem tendenziell eher niedrigere pH_{Lys} -Werte als die Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu zeigten die BEST1-KO und LRRC8A-KO Zellen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Die Zellreihen der einzelnen Subgruppen unterschieden sich zum Teil signifikant voneinander, was eine eindeutige Interpretation erschwerte.

Für CC wird neben antioxidativen, antikanzerogenen, antiinflammatorischen sowie neuroprotektiven Eigenschaften auch eine potentielle Rolle in der Behandlung von retinalen Erkrankungen untersucht. In dieser Arbeit wurde zusätzlich CCL verwendet, ein Wirkstoff der bei unverändertem Wirkmechanismus eine erhöhte Stabilität aufweist. In einer M. Best und einer ARB Zelllinie zeigte sich eine höhere BEST1 mRNA-Expression nach der Behandlung mit CCL, jedoch ohne statistische Signifikanz und ohne nachweisbaren Effekt auf Proteinebene. Die jeweils zweite M. Best und ARB Zelllinie zeigte keinerlei Reaktion auf die CCL-Zugabe. Eine mögliche Wirksamkeit von CCL scheint daher nur bei bestimmten Mutationen vorzuliegen, insgesamt bleibt der therapeutische Nutzen von CCL in der Behandlung von Bestrophinopathien daher fraglich.

8. Literaturverzeichnis

1. Marmorstein AD, Cross HE, Peachey NS. Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(3):206–26. doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.04.004.
2. Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, Jendryke T, Sirianant L, Wanitchakool P et al. Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(20):E2630-9. doi: 10.1073/pnas.1418840112.
3. Stöhr H, Marquardt A, Nanda I, Schmid M, Weber BHF. Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(4):281–4. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200796.
4. Marquardt A, Stöhr H, Passmore LA, Krämer F, Rivera A, Weber BH. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet* 1998; 7(9):1517–25. doi: 10.1093/hmg/7.9.1517.
5. Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T et al. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 19(3):241–7. doi: 10.1038/915.
6. Kane Dickson V, Pedi L, Long SB. Structure and insights into the function of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel. *Nature* 2014; 516(7530):213–8. doi: 10.1038/nature13913.
7. Yang T, Liu Q, Kloss B, Bruni R, Kalathur RC, Guo Y et al. Structure and selectivity in bestrophin ion channels. *Science* 2014; 346(6207):355–9. doi: 10.1126/science.1259723.
8. Owji AP, Wang J, Kittredge A, Clark Z, Zhang Y, Hendrickson WA et al. Structures and gating mechanisms of human bestrophin anion channels. *Nat Commun* 2022; 13(1):3836. doi: 10.1038/s41467-022-31437-7.
9. Miller AN, Vaisey G, Long SB. Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin. *eLife* 2019; 8. doi: 10.7554/eLife.43231.
10. Ji C, Kittredge A, Hopiavuori A, Ward N, Chen S, Fukuda Y et al. Dual Ca²⁺-dependent gates in human Bestrophin1 underlie disease-causing mechanisms of gain-of-function mutations. *Commun Biol* 2019; 2. doi: 10.1038/s42003-019-0433-3.
11. Li Y, Zhang Y, Xu Y, Kittredge A, Ward N, Chen S et al. Patient-specific mutations impair BESTROPHIN1's essential role in mediating Ca²⁺-dependent Cl⁻ currents in human RPE. *eLife* 2017; 6. doi: 10.7554/eLife.29914.
12. Sun H, Tsunenari T, Yau K-W, Nathans J. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):4008–13. doi: 10.1073/pnas.052692999.

13. Boon CJF, Klevering BJ, Leroy BP, Hoyng CB, Keunen JEE, Hollander AI den. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(3):187–205. doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.04.002.
14. Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien L-T. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 2008; 88(2):639–72. doi: 10.1152/physrev.00022.2007.
15. Marmorstein AD, Kinnick TR, Stanton JB, Johnson AA, Lynch RM, Marmorstein LY. Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis* 2015; 21:347–59.
16. Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA et al. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2013; 22(3):593–607. doi: 10.1093/hmg/ddr469.
17. Yardley J, Leroy BP, Hart-Holden N, Lafaut BA, Loeys B, Messiaen LM et al. Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathy (ADVIRC). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(10):3683–9. doi: 10.1167/iovs.04-0550.
18. Burgess R, Millar ID, Leroy BP, Urquhart JE, Fearon IM, Baere E de et al. Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *Am J Hum Genet* 2008; 82(1):19–31. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.08.004.
19. Michaelides M, Urquhart J, Holder GE, Restori M, Kayali N, Manson FDC et al. Evidence of genetic heterogeneity in MRCS (microcornea, rod-cone dystrophy, cataract, and posterior staphyloma) syndrome. *American journal of ophthalmology* 2006; 141(2):418–20. doi: 10.1016/j.ajo.2005.09.018.
20. Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, Burgess-Mullan R, Shweikh Y, Parry N et al. Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2009; 85(5):581–92. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.09.015.
21. Leiden Open Variation Database: BEST1 gene. Verfügbar unter: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/BEST1>.
22. Milenkovic A, Milenkovic VM, Wetzel CH, Weber BHF. BEST1 protein stability and degradation pathways differ between autosomal dominant Best disease and autosomal recessive bestrophinopathy accounting for the distinct retinal phenotypes. *Hum Mol Genet* 2018; 27(9):1630–41. doi: 10.1093/hmg/ddy070.
23. Milenkovic VM, Röhrli E, Weber BHF, Strauss O. Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 17):2988–96. doi: 10.1242/jcs.085878.
24. Best F. Über eine hereditäre Makulaaffektion. *Zeitschrift für Augenheilkunde* 1905; (13):199–212.
25. Mohler CW, Fine SL. Long-term evaluation of patients with Best's vitelliform dystrophy. *Ophthalmology* 1981; 88(7):688–92. doi: 10.1016/s0161-6420(81)34965-3.

26. Kaufman SJ, Goldberg MF, Orth DH, Fishman GA, Tessler H, Mizuno K. Autosomal dominant vitreoretinopathies. *Arch Ophthalmol* 1982; 100(2):272–8. doi: 10.1001/archopht.1982.01030030274008.
27. Chen CJ, Kaufman S, Packo K, Stöhr H, Weber BHF, Goldberg MF. Long-Term Macular Changes in the First Proband of Autosomal Dominant Vitreoretinopathies (ADVIRC) Due to a Newly Identified Mutation in BEST1. *Ophthalmic Genet* 2016; 37(1):102–8. doi: 10.3109/13816810.2015.1039893.
28. Nachtigal A-L, Milenkovic A, Brandl C, Schulz HL, Duerr LMJ, Lang GE et al. Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. *Int J Mol Sci* 2020; 21(5). doi: 10.3390/ijms21051597.
29. Kellner S, Stöhr H, Fiebig B, Weinitz S, Farmand G, Kellner U et al. Fundus Autofluorescence and SD-OCT Document Rapid Progression in Autosomal Dominant Vitreoretinopathies (ADVIRC) Associated with a c.256G A Mutation in BEST1. *Ophthalmic Genet* 2016; 37(2):201–8. doi: 10.3109/13816810.2015.1033556.
30. Lin T-C, Lin Y-Y, Hsu C-C, Yang Y-P, Yang C-H, Hwang D-K et al. Nanomedicine-based Curcumin Approach Improved ROS Damage in Best Dystrophy-specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Transplant* 2019; 28(11):1345–57. doi: 10.1177/0963689719860130.
31. Guziewicz KE, Cideciyan AV, Beltran WA, Komáromy AM, Dufour VL, Swider M et al. BEST1 gene therapy corrects a diffuse retina-wide microdetachment modulated by light exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(12):E2839-E2848. doi: 10.1073/pnas.1720662115.
32. Johnson AA, Lee Y-S, Chadburn AJ, Tammaro P, Manson FD, Marmorstein LY et al. Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1. *Exp Eye Res* 2014; 121:74–85. doi: 10.1016/j.exer.2014.02.006.
33. Sparrow JR, Boulton M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res* 2005; 80(5):595–606. doi: 10.1016/j.exer.2005.01.007.
34. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond)* 1995; 9 (Pt 6):763–71. doi: 10.1038/eye.1995.192.
35. Singh R, Kuai D, Guziewicz KE, Meyer J, Wilson M, Lu J et al. Pharmacological Modulation of Photoreceptor Outer Segment Degradation in a Human iPS Cell Model of Inherited Macular Degeneration. *Mol Ther* 2015; 23(11):1700–11. doi: 10.1038/mt.2015.141.
36. Liu J, Lu W, Reigada D, Nguyen J, Laties AM, Mitchell CH. Restoration of lysosomal pH in RPE cells from cultured human and ABCA4(-/-) mice: pharmacologic approaches and functional recovery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(2):772–80. doi: 10.1167/iovs.07-0675.

37. Turk B, Dolenc I, Lenarcic B, Krizaj I, Turk V, Bieth JG et al. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur J Biochem* 1999; 259(3):926–32. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00145.x.
38. Brandl C, Zimmermann SJ, Milenkovic VM, Rosendahl SMG, Grassmann F, Milenkovic A et al. In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). *Neuromolecular Med* 2014; 16(3):551–64. doi: 10.1007/s12017-014-8308-8.
39. Allegrini D, Raimondi R, Borgia A, Sorrentino T, Montesano G, Tsoutsanis P et al. Curcumin in Retinal Diseases: A Comprehensive Review from Bench to Bedside. *Int J Mol Sci* 2022; 23(7). doi: 10.3390/ijms23073557.
40. López-Malo D, Villarón-Casares CA, Alarcón-Jiménez J, Miranda M, Díaz-Llopis M, Romero FJ et al. Curcumin as a Therapeutic Option in Retinal Diseases. *Antioxidants (Basel)* 2020; 9(1). doi: 10.3390/antiox9010048.
41. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* 2019; 24(16). doi: 10.3390/molecules24162930.
42. Fu S, Kurzrock R. Development of curcumin as an epigenetic agent. *Cancer* 2010; 116(20):4670–6. doi: 10.1002/cncr.25414.
43. Mrudula T, Suryanarayana P, Srinivas PNBS, Reddy GB. Effect of curcumin on hyperglycemia-induced vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361(2):528–32. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.059.
44. Woo JM, Shin D-Y, Lee SJ, Joe Y, Zheng M, Yim JH et al. Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase-1 expression and reduction of reactive oxygen. *Mol Vis* 2012; 18:901–8.
45. Vasireddy V, Chavali VRM, Joseph VT, Kadam R, Lin JH, Jamison JA et al. Rescue of Photoreceptor Degeneration by Curcumin in Transgenic Rats with P23H Rhodopsin Mutation. *PLoS One* 2011; 6(6). doi: 10.1371/journal.pone.0021193.
46. Sibylle Wilfling. Einfluss von Curcumin und Curcumin light auf die Expression, Lokalisation und Degradation repräsentativer, Best vitelliforme Makuladystrophie verursachender BEST1-Mutanten [Dissertation]: Universität Regensburg.
47. Yanushkevich S, Zieminska A, Gonzalez J, Añazco F, Song R, Arias-Cavieres A et al. Recent advances in the structure, function and regulation of the volume-regulated anion channels and their role in immunity. *J Physiol* 2024. doi: 10.1113/JP285200.
48. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2019. Verfügbar unter: <https://www.R-project.org/>.
49. Ogle, D.H., J.C. Doll, P. Wheeler, and A. Dinno. 2022. FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.9.3. Verfügbar unter: <https://github.com/fishR-Core-Team/FSA>.

50. Anderson DH, Ozaki S, Nealon M, Neitz J, Mullins RF, Hageman GS et al. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation. *American journal of ophthalmology* 2001; 131(6):767–81. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11384575/>.
51. Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Raguz S, Gil J. Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle* 2008; 7(19):2956–9. doi: 10.4161/cc.7.19.6780.
52. Hanus J, Kolkin A, Chimienti J, Botsay S, Wang S. 4-Acetoxyphenol Prevents RPE Oxidative Stress-Induced Necrosis by Functioning as an NRF2 Stabilizer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(9):5048–59. doi: 10.1167/iovs.15-16401.
53. Filipek S, Stenkamp RE, Teller DC, Palczewski K. G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annu Rev Physiol* 2003; 65:851–79. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142611.
54. Kramm CM, Grip WJ de, Korf HW. Rod-opsin immunoreaction in the pineal organ of the pigmented mouse does not indicate the presence of a functional photopigment. *Cell Tissue Res* 1993; 274(1):71–8. doi: 10.1007/bf00327987.
55. Zhao Q, Kong Y, Kittredge A, Li Y, Shen Y, Zhang Y et al. Distinct expression requirements and rescue strategies for BEST1 loss- and gain-of-function mutations. *eLife* 2021; 10. doi: 10.7554/elife.67622.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μ	mikro
1D4	Rhodopsin
A.D.	<i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ACTB	β-Actin
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Anti-rb/-m	Anti- <i>rabbit</i> (Kaninchen), Anti- <i>mouse</i> (Maus)
APOE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARB	Autosomal-rezessive Bestrophinopathie
BEST1	Bestrophin 1
BSA	Bovines Serum Albumin
CC	Curcumin
CCL	Curcumin Light
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
CTNNB1	β-Catenin
CXCL2	<i>C-X-C motif chemokine ligand 2</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Desoxyribonukleosidtriphosphat (Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T))
DPBS	Dulbecco`s PBS
et al.	et aliter, und andere
g	Gramm
h	Stunde, human

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
hiPSC	<i>human induced pluripotent stem cells</i> , humane induzierte pluripotente Stammzellen
HO-1	<i>heme oxygenase-1</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
ICC	Immunocytochemie
IgG (H+L)	Immunglobulin G (<i>heavy + light chain</i> , leichte + schwere Kette)
kDA	Kilodalton
KO	Knock-out
KSOR	<i>Knock-out serum replacement</i> , Knock-out Serum Ersatz
l	Liter
LRRC8A	<i>leucine-rich repeat-containing protein 8A</i>
m	milli, Meter
M	molar
M. Best	Morbus Best
mAK	monoklonaler Antikörper
MDCKII	<i>Madin-Darby Canine Kidney Typ II</i>
MEM	<i>Modified Eagle's Medium</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MRCS	<i>microcornea, rod-cone dystrophy, cataract, posterior staphyloma</i> Mikrokornea, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, Katarakt, posteriores Staphylom
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	nano
N	Normal
NQO1	<i>NAD(P)H quinone dehydrogenase 1</i>
pAK	Polyklonaler Antikörper

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH _{Lys}	lysosomaler pH
POS	<i>photoreceptor outer segments</i> , Photorezeptor-Außensegmente
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	<i>retinal pigment epithelium</i> , retinales Pigmentepithel
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sgRNA	<i>single guide RNAs</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TEER	<i>Trans epithelial electrical resistance</i> , Transepithelische elektrische Widerstandsmessung
TEMED	Tetramethylethyldiamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VRACs	<i>volume regulated anion channels</i> , Volumen-regulierte Anionen-Kanäle
v/v, w/v	<i>volume/volume, weight/volume</i>
WB	Western Blot
ZK	Zellkultur

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	10
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper	12
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper	13
Tabelle 4: Verwendete Lösungen	14
Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmaterialien.....	16
Tabelle 6: Verwendete Kit- und Reaktionssysteme	17
Tabelle 7: Verwendete Enzyme.....	17
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide und Sonden für qRT-PCR	18
Tabelle 9: Verwendete Genotypen der hiPSC-RPE Zellen.....	19
Tabelle 10: Übersicht der für die einzelnen Versuche verwendeten Zelllinien.....	19
Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 12: Verwendete Geräte.....	21
Tabelle 13: Verwendete Software.....	23
Tabelle 14: Zusammensetzung des 5%iges Krohne ohne-Mediums.....	24
Tabelle 15: Zusammensetzung der Lösungen für die ICC	28
Tabelle 16: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese	29
Tabelle 17: Programm Thermocycler	29
Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR	30
Tabelle 19: Programm qRT-PCR.....	30
Tabelle 20: Zusammensetzung des 5x Lämmli-Puffers.....	30
Tabelle 21: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE	31
Tabelle 22: Zusammensetzung der Lösungen für den Western Blot	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kristallstruktur von BEST1.....	1
Abbildung 2: Charakteristische Fundusaufnahmen von M. Best, ADVIRC und ARB..	3
Abbildung 3: Skelettformeln von CC und CCL.....	8
Abbildung 4: Versuchsanordnung Wirkstoffbehandlung mit CCL.	27
Abbildung 5: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildung zur Lokalisation und Expression von BEST1 in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen.	35
Abbildung 6: Schema zur Langzeit POS Konditionierung.....	35
Abbildung 7: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Autofluoreszenz und Rhodopsin-Akkumulation in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Langzeit-Zugabe von POS.	37
Abbildung 8: mRNA-Expression von APOE in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Langzeit-POS-Zugabe.....	41
Abbildung 9: CXCL2-mRNA-Expression in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Zugabe von POS.....	44
Abbildung 10: NQO1 mRNA Expression in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Zugabe von POS.....	47
Abbildung 11: Verbleibende Rhodopsin-Menge in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach Zugabe von POS.	49
Abbildung 12: Lysosomaler pH-Wert in Kontroll-, BEST1-KO und LRRC8A-KO hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe.	51
Abbildung 13: Lysosomaler pH-Wert in Kontroll-, BEST1-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe, kumulativ.	52
Abbildung 14: Lysosomaler pH-Wert in Kontroll-, BEST1-KO, M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach POS-Zugabe, getrennt nach Zelllinie.....	54
Abbildung 15: Relative BEST1 mRNA-Expression in ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.	56
Abbildung 16: BEST1 Proteinexpression in ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.	57
Abbildung 17: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildungen zur Lokalisation und Expression von BEST1 in ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.	59
Abbildung 18: Relative BEST1 mRNA-Expression in M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.....	60
Abbildung 19: BEST1 Proteinexpression in M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL.....	61

Abbildung 20: Konfokale Immunfluoreszenz-Abbildung zur Lokalisation und Expression von BEST1 in M. Best und ARB hiPSC-RPE Zellen nach Behandlung mit CC und CCL. 62

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Maxi Riesenbeck, geboren am 10.02.1999 in Münster, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

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

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

Ort, Datum

Maxi Riesenbeck

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Bernhard Weber für das Ermöglichen meiner Promotion am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg.

Ganz besonders danke ich Andrea Milenkovic, für das gute Konzept meines Forschungsprojektes, die Betreuung und Anleitung meiner Laborarbeit und den fachlichen Input.

Dem gesamten Team am Institut danke ich für die unermüdlichen Erklärungen und die familiäre Atmosphäre im Labor. Auch meinen Mitdoktorand:innen möchte ich danken, für die Motivationsgespräche, immer wenn sie nötig waren.

Meinen Freund:innen und meiner Familie danke ich für die emotionale und finanzielle Unterstützung in den letzten Jahren. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht fertig geworden.