

DISSERTATION

Channelopathies – zelluläres Verhalten mutanter Proteine am
Beispiel von Anoctamin-4 und Bestrophin-1

Channelopathies – subcellular localisation of mutant proteins
taking anoctamin-4 und bestrophin-1 as examples

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Ronja Fini Sturm

Erstbetreuer: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhalt

1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	9
3.	Abstract	13
3.1.	Abstract auf Deutsch	13
3.2.	Abstract in English	14
4.	Einleitung	15
4.1.	Channelopathies	15
4.2.	Anoctamin-4	16
4.2.1.	Expressionsorte und Funktionen von Anoctamin-4	16
4.2.2.	Erkrankungen mit Assoziation zu Anoctamin-4	17
4.2.3.	Die Anoctamin-Familie	18
4.2.4.	HEK293-Zellen	19
4.3.	Bestrophin-1-Mutationen und Morbus Best	20
4.3.1.	Wo wird Bestrophin-1 exprimiert?	20
4.3.2.	Funktionen von Bestrophin-1	20
4.3.3.	Mutationen im Bestrophin-1-Gen	21
4.3.4.	Pathophysiologie von Bestrophin-1-Mutationen	21
4.3.5.	Erkrankungen ausgelöst durch Bestrophin-1-Mutationen	22
4.3.6.	Das iPSC-RPE-Zellmodell für Bestrophin-1-Mutationen	24
4.4.	Hintergrund zu den weiteren antigenen Strukturen für die immunzytochemischen Färbungen	26
4.4.1.	Pan-Cadherin und β -Catenin als Zellmembranmarker	26
4.4.2.	Das endolysosomale System	26
4.4.2.1.	Bestrophin-1 im endolysosomalen System	28
4.4.3.	Caspase 3	28
4.5.	Natriumphénylbutyrat als Chaperon	29
5.	Fragestellungen	29
5.1.	Fragestellungen zu Anoctamin-4	29

	2
5.2. Fragestellungen zu Bestrophin-1	30
6. Materialien und ihre Bezugsquellen	30
6.1. Geräte / Software und Hersteller (Tabelle 1)	30
6.2. Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2)	30
6.3. Reagenzien (Tabelle 3)	31
6.4. Zelllinien	33
6.5.1. Hergestellte Puffer, Lösungen und Medien	33
6.5.1.1. Zellkultur	33
6.5.1.2. Mutagenese und Plasmidvermehrung	33
6.5.1.3. Vorbereitung zur Immunzytochemie	34
6.5.1.4. Versuche vor Immunzytochemie-Färbung	34
6.5.1.5. Immunzytochemie	34
6.6. Kits und Hersteller (Tabelle 4)	35
7. Methodik	35
7.1. Erzeugen der gewünschten Mutationen	35
7.1.1. Nomenklatur der einzelnen Mutationen	35
7.1.2. Plasmide als Ausgangs-DNA	37
7.1.3. Protokoll für die zielgerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis)	37
7.1.4. Verwendete Primer für die Mutagenese	41
7.2. Methodik: Immunzytochemie an HEK293-Zellen zur Untersuchung von Anoctamin-4	42
7.2.1. Zellkulturbedingungen für HEK293-Zellen	42
7.2.2. Transfektion und Mediumwechsel	42
7.2.3. Immunzytochemie-Färbung	43
7.2.4. Primäre Antikörper für Immunzytochemie an HEK293-Zellen (Tabelle 10)	44
7.2.5. Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie an HEK293-Zellen (Tabelle 11)	45
7.2.6. Versuche vor/ während der Immunzytochemie	45

7.2.6.1.	Experimente mit Natriumphénylbutyrat als Chaperon mit der Frage nach einer Veränderung des Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Pan-Cadherin und Anoctamin-4	45
7.2.6.2.	Untersuchungen zur Apoptoserate Anoctamin-4-transfizierter HEK-Zellen mit dem anti-cleaved Caspase-3-Antikörper	45
7.2.7.	Negativkontrollen	46
7.2.8.	Mikroskopieren der Immunzytochemie an mit Anoctamin-4-transfizierten HEK293-Zellen	46
7.3.	Methodik: Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen zur Untersuchung von Bestrophin-1	48
7.3.1.	Auftauen und Aussäen der iPS-RPE-Zellen	48
7.3.2.	Transfektion	50
7.3.3.	Experimente mit Natriumphénylbutyrat als Chaperon mit der Frage nach einer Veränderung der Pearson's Korrelationskoeffizienten	50
7.3.4.	Immunzytochemie-Färbung	51
7.3.5.	Primäre Antikörper für Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen (Tabelle 12)	52
7.3.6.	Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen (Tabelle 13)	52
7.3.7.	Mikroskopieren der Färbungen von iPS-RPE-Zellen	53
7.3.8.	Negativkontrollen	53
7.4.	Methodik: Auswertung der Immunzytochemie-Färbungen (HEK293-Zellen und iPS-RPE-Zellen)	53
7.4.1.	Auswertung mit ImageJ - Errechnen der Pearson's Korrelationskoeffizienten und Ermittlung von Pixelquotienten	53
7.4.2.	Statistische Auswertung	54
7.4.2.1.	Statistische Auswertung der Versuche zu Anoctamin-4	54
7.4.2.2.	Statistische Auswertung der Versuche zu Bestrophin-1	56
8.	Ergebnisse	56
8.1.	Immunzytochemische Färbungen zu Anoctamin-4 in HEK293-Zellen	56
8.1.1.	Untersuchungen zur Zellmembranexpression von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK293-Zellen	58
8.1.1.1.	Mittelwerte der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin aus den Samples 1 – 4 zeigen eine große Schwankungsbreite	58

8.1.1.2. Einfluss der Verwendung verschiedener DNA-Mengen zur Transfektion auf die Zellmembranexpression von Anoctamin-4	59
8.1.1.3. Einfluss der Zeitspanne zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen auf die Zellmembranexpression von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK-Zellen	61
8.1.1.4. Insgesamt zeigt sich Anoctamin-4-Wildtyp mit einer Zellmembranexpression von 56%	62
8.1.2. Vergleich von sieben verschiedenen Anoctamin-4-Mutationen mit Wildtyp-Anoctamin-4 hinsichtlich ihrer Expression in der Zellmembran	63
8.1.2.1. Vergleich von sieben verschiedenen Anoctamin-4-Mutationen mit Wildtyp-Anoctamin-4 hinsichtlich ihrer Zellmembranexpression bei einem Zeitintervall von 24 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen	63
8.1.2.2. Einfluss einer verkürzten Zeitspanne von 12 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung auf den Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin beim Vergleich des Wildtyps mit drei Mutationen	67
8.1.3. Experimente mit Natriumphénylbutyrat als Chaperon mit der Frage nach einem verbesserten Transport mutierter Anoctamin-4-Proteine in die Zellmembran	69
8.1.4. Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Anoctamin-4 durch Färbungen mit einem Antikörper gegen frühe Endosomen	70
8.1.5. Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Anoctamin-4 durch Färbungen mit einem Antikörper gegen Lysosomen	75
8.1.6. Färbungen mit einem Antikörper gegen cleaved Caspase 3	77
8.2. Immunzytochemische Färbungen zu Bestrophin-1 in iPSC-RPE	78
8.2.1. Qualitative Beurteilung der Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen	79
8.2.1.1. Sample A – qualitative Beurteilung der Immunzytochemie	79
8.2.1.2. Sample B – qualitative Beurteilung der Immunzytochemie	81
8.2.2. Quantitative Beurteilung der Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen	86
8.2.2.1. Sample A – quantitative Beurteilung der Immunzytochemie	86
8.2.2.2. Sample B – quantitative Beurteilung der Immunzytochemie	88
9. Diskussion	94
9.1. Diskussion der Ergebnisse zu Anoctamin-4	94
9.1.1. Expression von Anoctamin-4 in der Zellmembran	94
9.1.1.1. Expression von Wildtyp-Anoctamin-4 in der Zellmembran	94
9.1.1.2. Einfluss der Anoctamin-4-Mutationen auf die Zellmembranexpression der Anoctamin-4-Proteine	95
9.1.2. Expression von Anoctamin-4 in anderen Zellorganellen	96

9.1.3.	Führen Anoctamin-4-Mutationen zu einer erhöhten Apoptoserate?	98
9.1.4.	Durch Anoctamin-4-Mutationen verursachte Epilepsien	99
9.1.5.	Stellt Natriumphenylbutyrat einen geeigneten Chaperon für die Anoctamin-4-Mutatanten dar?	101
9.1.6.	Mögliche Erklärungen für die große Schwankungsbreite der Pearson's Korrelationskoeffizienten (zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin) beim Wildtyp-Anoctamin-4 zwischen verschiedenen Samples	102
9.2.	Diskussion der Ergebnisse zu Bestrophin-1	103
9.2.1.	Vergleich der Ergebnisse der Immunzytochemie mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zu Bestrophin-1	103
9.2.1.1.	Intrazelluläres Verhalten von Bestrophin-1 – Assoziation von Bestrophin-1 mit den Zellorganellmarkern Lamp1 und EEA1 in iPS-RPE-Zellen	103
9.2.1.2.	Zelluläre Lokalisation von $Ca_v1.3$ – einem wichtigen Interaktionspartner von Bestrophin-1	109
9.2.2.	Therapiemöglichkeiten – ist Natriumphenylbutyrat bei Morbus Best wirksam?	112
9.2.3.	Diskussion zur Qualität der Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen	114
9.3.	Schlussfolgerungen zu den untersuchten Channelopathies	116
10.	Literaturverzeichnis	118
11.	Eidesstattliche Versicherung	124
12.	Lebenslauf	125
13.	Danksagung	126
14.	Bescheinigung zur Statistikberatung	127

1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADVIRC	autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie
Ano4	Anoctamin-4
ARB	autosomal-rezessive Bestrophinopathie
ARPE-19-Zellen	Adulte retinale Pigmentepithelzellen, spontan immortalisierte RPE-Zelllinie eines 19-jährigen Mannes
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
AVMD	Adulte Vitelliforme Makuladystrophie
Best1	Bestrophin-1
BIP	binding immunoglobulin protein – ein Chaperon im Endoplasmatischen Retikulum
BVMD	Best'sche Vitelliforme Makuladystrophie, Morbus Best
BSA	Bovines Serumalbumin (Albumin aus Rinderserum)
Ca²⁺	Calcium
CaCC	Calciumaktivierter Chloridkanal
Ca_v1.3	voltage-dependent Calcium channel – ein L-Typ-Calciumkanal
CBF	Campus Charité Benjamin Franklin
CCM	Campus Charité Mitte
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary cells – immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters
Cl⁻	Chlorid
COS-7-Zellen	CV-1 in Origin carrying SV40 cells – immortalisierte Zelllinie aus CV-1-Zellen einer afrikanischen grünen Meerkatze
CVK	Campus Charité Virchow Klinikum
DAPI	direkt, interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidin-2-phenylindol)
DE	entwicklungsbedingte Enzephalopathien (developmental encephalopathy)
DEE	entwicklungsbedingte und epileptische Enzephalopathie (developmental and epileptic encephalopathy)
EE	epileptische Enzephalopathie (epileptic encephalopathie)
EEA1	Frühes Endosomen-Antigen 1 (early endosome antigen 1)
eNaC	epithelialer Natriumkanal (epithelial Natrium channel)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

FBS	Fötiales Kälberserum
GEFS+	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (Fieberkrämpfe auch im Alter über 5 Jahren), (genetic epilepsy with febrile seizures plus)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HEK293-Zellen	Humane Embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney), auch als HEK-Zellen oder 293-Zellen bezeichnet
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen (induced pluripotent stem cell)
iPSC-RPE / iPS-RPE-Zellen	Zu retinalen Pigmentepithelzellen differenzierte induziert pluripotente Stammzellen
Lamp1	Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1 (lysosome-associated membrane protein 1)
LB-Medium/-Agar	(lysogeny broth) – komplexes Kulturmedium. Enthält 10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl und hat einen pH-Wert von 7,0. Für die Herstellung von Agarplatten ist Agar zugesetzt.
MDCK-II-Zellen	Zelllinie aus Nierengewebe eines Hundes (Madin-Darby canine kidney cells)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ns	Statistisch nicht signifikant (p-Wert > 0,05)
Pat.-iPSC	iPS-Zellen eines an Morbus Best erkrankten Patienten (mit endogener Bestrophin-1-Mutation)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCC	Pearson's Korrelationskoeffizient (Pearson's Correlation Coefficient)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PS	Phosphatidylserin
P/S	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
Sample	Immunzytochemische Färbung eines Datums. Färbungen mit denselben Antikörperkombinationen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden erhalten jeweils eine andere Sample-Nummer (aufsteigend) und können somit voneinander unterschieden werden.
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)

SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
TBS-Puffer	Tris-buffered saline-Puffer
TLE	Temporallappenepilepsie (temporal lobe epilepsy)
4PBA	Natriumphenylbutyrat (das Salz der 4-Phenylbuttersäure), (4-phenylbutyric acid)
*	p-Wert $\leq 0,05$
**	p-Wert $\leq 0,01$
***	p-Wert $\leq 0,001$
****	p-Wert $\leq 0,0001$

2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	Geräte / Software und Hersteller	Seite 31
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien	Seite 32
Tabelle 3:	Reagenzien	Seite 32
Tabelle 4:	Kits und Hersteller	Seite 36
Tabelle 5:	Nomenklatur der hergestellten Anoctamin-4-Mutationen	Seite 37
Tabelle 6:	Nomenklatur der hergestellten Bestrophin-1-Mutationen	Seite 38
Tabelle 7:	Spezifische Abweichungen vom Hersteller-Protokoll bei den einzelnen Anoctamin-4- und Bestrophin-1-Mutationen	Seite 41
Tabelle 8:	verwendete Primer für die Mutagenese der gewünschten Punktmutationen im Anoctamin-4-Gen	Seite 42
Tabelle 9:	verwendete Primer für die Mutagenese der gewünschten Mutationen im Bestrophin-1-Gen	Seite 42
Tabelle 10:	Primäre Antikörper für Immunzytochemie an HEK293-Zellen	Seite 45
Tabelle 11:	Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie an HEK293-Zellen	Seite 46
Tabelle 12:	Primäre Antikörper für Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen	Seite 53
Tabelle 13:	Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen	Seite 54
Tabelle 14:	Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin von Wildtyp-Anoctamin-4 aus verschiedenen Samples	Seite 60
Tabelle 15:	Einfluss von verschiedenen Mengen an transfizierter DNA auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin	Seite 61

Tabelle 16:	Einfluss des Zeitintervalls zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin	Seite 63
Tabelle 17:	Kumulative Ergebnisse zu Anoctamin-4-Wildtyp	Seite 64
Tabelle 18:	Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin vom Anoctamin-4-Wildtyp mit sieben verschiedenen Mutanten	Seite 67
Tabelle 19:	Einfluss des verkürzten Zeitintervalls von 12 Stunden (zwischen Transfektion und Fixierung) auf den Vergleich des Wildtyps mit drei Mutanten hinsichtlich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin	Seite 69
Tabelle 20:	Darstellung der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und EEA1 (als Marker für frühe Endosomen)	Seite 75
Tabelle 21:	Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Lamp1 (als Marker für Lysosomen)	Seite 77
Tabelle 22:	Bestrophin-1 in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A)	Seite 88
Tabelle 23:	L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.3$ in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A)	Seite 89
Tabelle 24:	Bestrophin-1 in Lysosomen in iPS-RPE-Zellen	Seite 91
Tabelle 25:	Bestrophin-1 in frühen Endosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B)	Seite 92
Tabelle 26:	Kolokalisation von $Ca_v1.3$ und Lysosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B)	Seite 93
Tabelle 27:	Kolokalisation von $Ca_v1.3$ und β -Catenin in iPS-RPE-Zellen (Sample B)	Seite 94

Abbildung 1:	Schematische Skizzierung zum Ablauf der Mutagenese	Seite 39
Abbildung 2:	Immunzytochemie von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK293-Zellen	Seite 58
Abbildung 3:	Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin von Wildtyp-Anoctamin-4 aus verschiedenen Samples	Seite 59
Abbildung 4:	Einfluss der Menge an transfizierter DNA auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin	Seite 61
Abbildung 5:	Einfluss des Zeitintervalls zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin	Seite 62
Abbildung 6:	Vergleich von sieben verschiedenen Anoctamin-4-Mutanten mit Wildtyp-Anoctamin-4 hinsichtlich ihrer Zellmembranexpression in HEK-Zellen	Seite 65
Abbildung 7:	Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin vom Anoctamin-4-Wildtyp mit sieben verschiedenen Mutanten	Seite 66
Abbildung 8:	Einfluss des verkürzten Zeitintervall von 12 Stunden (zwischen Transfektion und Fixierung) auf den Vergleich des Wildtyps mit drei Mutanten hinsichtlich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin	Seite 68
Abbildung 9:	Einfluss von Natriumphénylbutyrat (4PBA) auf die Zellmembranexpression mutanter Anoctamin-4-Proteine	Seite 70
Abbildung 10:	Einfluss von Natriumphénylbutyrat (4PBA) auf die Zellmembranexpression mutanter Anoctamin-4-Proteine	Seite 71
Abbildung 11:	Anoctamin-4 in frühen Endosomen bei immunzytochemischen Färbungen an HEK293-Zellen	Seite 73

Abbildung 12:	Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und EEA1 (als Marker für frühe Endosomen)	Seite 74
Abbildung 13:	Anoctamin-4 in Lysosomen bei immunzytochemischen Färbungen an HEK293-Zellen	Seite 76
Abbildung 14:	Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Lamp1 (als Marker für Lysosomen)	Seite 77
Abbildung 15:	Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen eines Patienten mit endogener Bestrophin-1-Mutation	Seite 81
Abbildung 16:	Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen Bestrophin-1 und Lamp1 als Lysosomenmarker	Seite 83
Abbildung 17:	Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen Bestrophin-1 und EEA1 als Marker für frühe Endosomen	Seite 84
Abbildung 18:	Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen den L-Typ-Calciumkanal Cav1.3 und gegen den Lysosomenmarker Lamp1	Seite 85
Abbildung 19:	Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen den L-Typ-Calciumkanal Cav1.3 und gegen den Membranmarker β -Catenin	Seite 86
Abbildung 20:	Bestrophin-1 in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A)	Seite 87
Abbildung 21:	L-Typ-Calciumkanal Cav1.3 in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A)	Seite 88
Abbildung 22:	Bestrophin-1 in Lysosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B)	Seite 90
Abbildung 23:	Bestrophin-1 in frühen Endosomen in iPS-RPE-Zellen	Seite 91
Abbildung 24:	Kolokalisation von Cav1.3 und Lysosomen in iPS-RPE-Zellen	Seite 93

3. Abstract

3.1. Abstract auf Deutsch

Einleitung: Ziel der immunzytochemischen Versuche war es, Anoctamin-4 (ein calciumabhängiger Kationenkanal) und Bestrophin-1 (ein calciumabhängiger Chloridkanal) sowie verschiedene Mutanten dieser Ionenkanäle hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation zu untersuchen, um beide Ionenkanäle besser zu charakterisieren und um langfristig kausale Therapieansätze für die resultierenden Krankheiten (verschiedene Epilepsien für Anoctamin-4-Mutationen und Morbus Best für Bestrophin-1-Mutationen) zu entwickeln.

Methodik: An HEK293-Zellen wurde immunzytochemisch das Verhalten von Anoctamin-4-Wildtyp und sieben verschiedenen Mutanten hinsichtlich ihrer Expression in der Zellmembran, sowie ihrer Lokalisation in frühen Endosomen und Lysosomen, untersucht. Für Bestrophin-1 wurden iPS-RPE-Zellen verwendet, die entweder eine endogene Mutation trugen oder mit Bestrophin-1-Wildtyp oder mit der Mutation T6P transfiziert wurden und mit Antikörpern gegen den Zellmembranmarker β -Catenin, gegen frühe Endosomen und Lysosomen, sowie gegen den L-Typ-Calciumkanal Cav1.3 gefärbt wurden. Weiterhin wurde der Einfluss von Natriumphanylbutyrat als Chaperon auf den mutationsbedingten Trafficking-Defekt für beide Proteine untersucht. Die Assoziation von Anoctamin-4 und Bestrophin-1 zu den verschiedenen zellulären Antigenen wurde durch die Errechnung des Pearson's Korrelationskoeffizienten erfasst.

Ergebnisse: Anoctamin-4-Wildtyp wird zu 56% in der Zellmembran exprimiert, der restliche Anteil liegt im Zytosol vor. Die untersuchten Anoctamin-4-Mutationen führen zu einer signifikant geringeren Expression von Anoctamin-4 in der Zellmembran und in den frühen Endosomen im Vergleich zum Wildtyp. Bezüglich der Lokalisation in den Lysosomen ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Anoctamin-4-Wildtyp und den Mutationen. Natriumphanylbutyrat hat keine signifikanten Effekte auf die Zellmembranexpression der Anoctamin-4-Mutanten. Die Datendichte zur Immunzytochemie an den iPS-RPE-Zellen ist nicht ausreichend, um fundierte konkrete Schlussfolgerungen zu Bestrophin-1 zu ziehen.

Diskussion: Zwar führen die untersuchten Anoctamin-4-Mutationen zu einer signifikant geringeren Expression von Anoctamin-4 in der Zellmembran und in den frühen Endosomen im Vergleich zum Wildtyp, jedoch ist der Trafficking-Defekt geringer ausgeprägt als die in der Literatur beschriebenen mutationsbedingten Funktionseinschränkungen von Anoctamin-4 als Kationenkanal. Eine Ursache für diese Diskrepanz könnten Strukturmodellanalysen liefern, die für die Anoctamin-4-Mutationen eine geringere Stabilität, teilweise eine Ladungsänderung und teilweise eine Lokalisation nahe der Calciumbindungsstelle vorhersagten. Die für Bestrophin-1 beschriebenen mutationsbedingten Effekte der reduzierten Zellmembranexpression und der Akkumulation im endolysosomalen System konnten nur teilweise repliziert werden. Ursächlich dafür scheint das noch nicht ausreichend optimierte Färbeprotokoll an den anspruchsvollen iPS-RPE-Zellen zu sein.

3.2. Abstract in English

Introduction: The purpose of the study is to get deeper insights into the cellular localisation of anoctamin-4 (a Ca^{2+} -dependent cation channel) and bestrophin-1 (a Ca^{2+} -dependent Cl^- -channel) by means of immunocytochemistry – in order to characterize different mutant forms of these ion channels and generate hypotheses on putative pathomechanisms for anoctamin-4 or bestrophin-1 associated hereditary diseases. In the long-term, this could help develop possible therapeutic strategies against the resulting channelopathies (different forms of epilepsies for anoctamin-4-mutations and Best Vitelliform Macular Dystrophy for bestrophin-1-mutations).

Methods: HEK293 cells were transfected with wildtype anoctamin-4 and seven mutations (with known cases of hereditary epilepsy) and stained against cell surface (pan-cadherin), endosomal (early endosome antigen 1, EEA1) and lysosomal (lysosome-associated membrane protein 1, Lamp1) markers. iPSC-RPE-cells were used for immunocytochemistry to study endogenously expressed mutant bestrophin-1 as well as transfected wildtype bestrophin-1 and the co-transfected mutation T6P. iPSC-RPE were analysed for subcellular bestrophin-1 localisation using co-staining against early endosomal (EEA1) and lysosomal (Lamp1) markers, against the cell membrane marker β -Catenin and against Cav1.3 (a L-type Ca^{2+} -channel known to interact with bestrophin-1). Furthermore, the effect of the molecular chaperone 4-phenylbutyric acid (4PBA) on the trafficking defects of both ion channels was assessed. The co-localization of the two ion channels with the cellular antigens was calculated using the Pearson's correlation coefficient.

Results: Wildtype anoctamin-4 showed a cell surface expression of 56%, the rest of anoctamin-4 appeared intracellular. The mutations lead to a reduced expression of anoctamin-4 in the cell membrane and in early endosomes, when compared to the wildtype. No changes were observed for the localisation in lysosomes between wildtype anoctamin-4 and its mutant forms. 4PBA had no significant effect on the cell surface expression of mutant anoctamin-4. The data collected from staining the iPSC-RPE was not sufficient to make definite conclusions for bestrophin-1.

Discussion: The observed trafficking defects of mutant anoctamin-4 in immunocytochemistry is relatively mild when compared to the severe effects of the mutants on the channel activity of anoctamin-4, as described in the literature. Structural analysis of anoctamin-4 might explain this difference – as there was a predicted destabilized folding for all mutations, and for some mutations a localisation near the calcium binding site. Bestrophin-1 mutants are supposed to show a reduced cell surface expression and to accumulate in the endolysosomal system. The conducted immunocytochemistry only partially confirms the effects described in the literature. This is most probably caused by a currently sub-optimal staining protocol for the complicated handling of the iPSC-RPE-cells.

4. Einleitung

4.1. Channelopathies

Ionenkanäle sind Transmembranproteine (in der Zellmembran und in der Membran von Zellorganellen), die einen passiven Ionenstrom über die Membran ermöglichen. Sie können charakterisiert werden durch ihre Permeabilität (beispielsweise stellt Anoctamin-4 einen Kationenkanal dar und Bestrophin-1 einen Chloridkanal), über den Mechanismus der Öffnung, die Struktur und die Gewebeexpression. Die Öffnung kann reguliert werden durch second messenger wie Calcium (Anoctamin-4 und Bestrophin-1 sind jeweils calciumaktivierte Ionenkanäle), aber auch durch Änderungen des Membranpotentials (Spannungsabhängigkeit), Liganden (Hormone, Neurotransmitter), Licht, Temperatur oder mechanische Reize (Mechanosensitivität). Ionenkanäle können aus einer einzelnen Einheit aufgebaut sein oder aus mehreren Einheiten, so wie Anoctamin-4 (Homodimer) und Bestrophin-1 (Pentamer). Ionenkanäle sind für verschiedene Funktionen von Zellen essenziell – in der Herstellung des Membranpotentials, in der Signaltransduktion, in der Freisetzung von Neurotransmittern und in der Hormonsekretion, für die Muskelkontraktion und die Volumenregulation, sowie im Wachstum, in der Mobilität und während der Apoptose (Kim, 2014). So ist es nachvollziehbar, dass Funktionseinschränkungen der Ionenkanäle zu zahlreichen Erkrankungen in verschiedensten Organsystemen – sogenannten Channelopathies (Ionenkanalerkrankungen) – führen können. Channelopathies sind meist genetisch bedingt, können aber auch erworben sein (Kim, 2014), beispielsweise durch unerwünschte Medikamentenwirkungen.

Mutationen in Ionenkanalgenen können verschiedene Effekte auf molekularer Ebene haben: sie können beispielsweise zum verfrühten Abbau fehlgefalteter Proteine und zu einer geringeren Proteinstabilität führen. Durch eine große Menge an abzubauenen Proteinen können die Degradierungswege der Zellen überlastet werden und zur Akkumulation von Proteindegradationsprodukten führen. Weiterhin kann der Transport mutanter Ionenkanäle (Trafficking) gestört sein, sowie die Zusammenlagerung einzelner Proteinmoleküle. Die Funktion der Ionenkanäle kann auch direkt durch die Mutationen beeinträchtigt sein, beispielsweise durch eine Beeinträchtigung ihrer Aktivierung, Veränderungen in ihrer Ligandenbindungsstelle oder eine gestörte Öffnungsfähigkeit (Milenkovic, Milenkovic, Wetzel und Weber, 2018; Milenkovic, Röhl, Weber und Strauss, 2011; Johnson, Guziwicz, Lee et al., 2017; Yang, Begemann, Reichhart et al., eingereicht)

4.2. Anoctamin-4

4.2.1. Expressionsorte und Funktionen von Anoctamin-4

Anoctamin-4 (TMEM16D) ist ein relativ wenig erforschtes Protein. Es gehört zur Familie der Anoctamine – einer Proteinfamilie, die aus 10 Homologen besteht (Anoctamin-1 bis Anoctamin-10) und auch unter dem Namen TMEM16 (TMEM16A bis TMEM16K) bekannt ist. Oft sind mehrere verschiedene Anoctaminhomologe im gleichen Zelltyp zusammen exprimiert (Kunzelmann, Cabrita, Wanitchakool et al., 2016).

Lokalisation von Anoctamin-4:

Lokalisiert ist das Anoctamin-4-Gen auf Chromosom 12q22-q23.3 (Claes, Audenaert, Deprez et al., 2004; Yang et al., eingereicht). Exprimiert wird Anoctamin-4 vor allem im Nervengewebe (Reichhart, Schöberl, Keckeis et al., 2019; Pedemonte und Galletta, 2014). Aber auch in einigen Genitalorganen, in endokrinen Drüsen und im RPE (retinales Pigmentepithel) wurde eine Anoctamin-4-Expression nachgewiesen (Reichhart, Milenkovic, Wetzel und Strauß, 2021; Maniero, Scudieri, Haris Shaikh et al., 2019; Reichhart et al., 2019).

Lokalisation von Anoctamin-4 innerhalb der Zellen:

In der Literatur werden verschiedene Erkenntnisse zur Lokalisation von Anoctamin-4 innerhalb der Zellen beschrieben. So wurde in HEK293-Zellen immunzytochemisch eine Zellmembranexpression nachgewiesen – in der äußeren Zellmembran und in der Membran von Organellen (Reichhart et al., 2019; Tian, Schreiber und Kunzelmann, 2012). Aber auch eine intrazelluläre Lokalisation in HEK293-Zellen, CHO-Zellen und COS-7-Zellen wird berichtet (Duran, Qu, Osunkoya et al., 2012). Andere Autoren weisen eine Expression im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nach (Cabrita, Benedetto, Fonseca et al., 2017).

Funktion von Anoctamin-4:

Für Anoctamin-4 wurde die Funktion eines calciumabhängigen Kationenkanals nachgewiesen (Reichhart et al., 2021; Reichhart et al., 2019; Yang et al., eingereicht). Anoctamin-4 hat nur eine geringe Selektivität für Kalium > Natrium > Lithium und wird deshalb als nicht-selektiver Ionenkanal eingestuft (Reichhart et al., 2019). Vermutlich spielt Anoctamin-4 auch eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Calciumspeicher (Cabrita et al., 2017). Es wird im ER exprimiert und wird durch SOCE (store-operated calcium entry) aktiviert. Anoctamin-4 bewirkt eine Leerung der Calciumspeicher im ER, wodurch ein Calciumeinstrom in das ER ermöglicht wird. Über diesen Mechanismus könnte Anoctamin-4 die Aktivierung von calciumabhängigen Chloridkanälen in der Zellmembran bewirken, wie die Aktivierung von Anoctamin-6 (Cabrita et al., 2017). Für Anoctamin-4 wurde zudem eine Funktion als Scramblase nachgewiesen (Suzuki, Fujii, Imao et

al., 2013; Yang et al., eingereicht). Die Phospholipide innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembran sind asymmetrisch verteilt. So ist Phosphatidylserin (PS) vor allem in der inneren Schicht der Lipiddoppelschicht zu finden (Balasubramanian und Schroit, 2003). Eine Änderung der Lipidasymmetrie, beispielsweise durch eine schnelle Phosphatidylserin-Externalisierung durch Scramblasen, ist wichtig für verschiedene Prozesse, beispielsweise für die Erkennung und Beseitigung apoptotischer Zellen, für die Thrombozytenaktivierung oder für die Interaktion von Lymphozyten mit Antigenpräsentierenden Zellen (Suzuki et al., 2013). Weiterhin wurde für Anoctamin-4 eine Funktion in der Regulation der Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde nachgewiesen (Maniero et al., 2019; Maniero, Zhou, Shaikh et al., 2015).

Aufbau des Anoctamin-Proteins:

Der Name „Anoctamin“ entstand aus der Vermutung, dass Anoctamine acht Transmembrandomänen besitzen. Diesen Hinweis ergaben Hydrophilie-Diagramme (Hydropathy analysis) (Yang, Cho, Koo et al., 2008; Hartzell, Yu, Xiao et al., 2009). Inzwischen legen Röntgenkristallografische Untersuchungen nahe, dass Anoctamine aus zehn Transmembrandomänen bestehen (Brunner, Lim, Schenck et al., 2014; Kalienkova, Clerico Mosina, Bryner et al., 2019). Anoctamine lagern sich zu Homodimeren zusammen (Kunzelmann et al., 2016; Picollo, Malvezzi und Accardi, 2015; Brunner et al., 2014). Der N- und der C-Terminus liegen jeweils im Zytosol. Die Calciumbindung scheint eine konservierte Eigenschaft aller Anoctamine zu sein und ist eine intrinsische Eigenschaft, denn Calcium scheint direkt an das Anoctamin-Protein zu binden (Picollo, Malvezzi und Accardi, 2015).

4.2.2. Erkrankungen mit Assoziation zu Anoctamin-4

Die untersuchten Anoctamin-4-Mutationen wurden als Ursache für verschiedene Epilepsieformen identifiziert (Yang et al., eingereicht). Auch bei anderen neurologischen Erkrankungen sowie psychiatrischen Erkrankungen konnten Assoziationen zu Änderungen im Anoctamin-4-Gen festgestellt werden – wie bei der Schizophrenie (Athanasias, Mattingsdal, Kähler et al., 2010), dem Morbus Alzheimer (Sherva, Tripodis, Bennett et al., 2014), bei der Depression (Webb, Guo, Maher et al., 2012) oder bei Neurotizismus (Terracciano, Sanna, Uda et al., 2010).

Darüber hinaus scheint Anoctamin-4 mit weiteren Erkrankungen assoziiert zu sein. So wurde in aktiven Läsionen von an Multipler Sklerose erkrankten Personen erhöhte Anoctamin-4-Spiegel gemessen (Hendrickx, van Scheppingen, van der Poel et al., 2017). Außerdem könnte Anoctamin-4 (neben anderen Genen) als Scramblase in der Regulation der Endo- und Exozytose beteiligt sein. Dies könnte eine pathophysiologische Erklärung zur Entstehung von Metastasen beim Mamma-Karzinom sowie einen Therapieansatz darstellen (Wittkowski, Dadurian, Seybold et al., 2018). Weiterhin konnte Anoctamin-4 als prognostischer Biomarker beim nicht-

metastasierten Klarzelligen Nierenzellkarzinom identifiziert werden - eine geringere Anoctamin-4-Expression war mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit und einem kürzeren progressionsfreiem Intervall assoziiert (Al Sharie, Al Zu'bi, El-Elimat et al., 2023).

4.2.3. Die Anoctamin-Familie

Die Aminosäuresequenz innerhalb der Anoctamine ist hoch konserviert (Duran et al., 2012; Yang et al., eingereicht) und die Proteine scheinen eine sehr ähnliche Struktur zu haben (Kunzelmann, Kongsuphol, Aldehni et al., 2009). Die Funktionen der einzelnen Anoctamine und die Expressionsorte sind aber sehr vielfältig. Anoctamine stellen calciumaktivierte Proteine dar und fungieren als Ionenkanäle und/oder Phospholipid-Scramblasen und können andere Ionenkanäle regulieren (Reichhart et al., 2021; Picollo, Malvezzi und Accardi, 2015; Reichhart et al., 2019; Yang et al., eingereicht). Während Anoctamin-4 bisher nicht sehr umfassend untersucht wurde, sind zu anderen Anoctamin-Homologen bereits mehr Experimente durchgeführt worden.

Anoctamin-1, Anoctamin-2, Anoctamin-5 und Anoctamin-6 gehören zu den besser untersuchten Anoctaminen. 2008 haben 3 Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Anoctamin-1 und -2 als calciumaktivierte Chloridkanäle – CaCC – identifiziert (Caputo, Caci, Ferrera et al., 2008; Yang et al., 2008; Schroeder, Cheng, Jan und Jan, 2008). Sie erfüllen sehr vielfältige Aufgaben. So spielt Anoctamin-1 eine bedeutende Rolle in der epithelialen Chloridsekretion (Ousingsawat, Martins, Schreiber et al., 2009; Rock, O'Neal, Gabriel et al., 2009), in der Peristaltik der glatten Muskulatur (Thomas-Gatewood, Neeb, Bulley et al., 2011; Manoury, Tamuleviciute und Tamaro, 2010) und in der Nozizeption (Liu, Linley, Du et al., 2010). Anoctamin-2 ist als CaCC in den Riechzellen an der Geruchswahrnehmung beteiligt (Tian, Schreiber und Kunzelmann, 2012; Picollo, Malvezzi und Accardi, 2015; Sagheddu, Boccaccio, Dibattista et al., 2010). Untermauert werden diese Schlussfolgerungen durch Erkrankungen, die durch Mutationen in Anoctamin-Genen entstehen. Anoctamin-2-Mutationen können zu Riechstörungen führen und Anoctamin-1-Mutationen sind mit Tumoren, der Mukoviszidose und Kolonerkrankungen assoziiert (Ji, Guo, Wang et al., 2019; Kunzelmann, Ousingsawat, Cabrita et al., 2019; Crottès und Jan, 2019; Pifferi, Cenedese und Menini, 2012).

Anoctamin-6 wurde als erstes Anoctamin mit einer Scramblasefunktion entdeckt (Suzuki, Umeda, Sims und Nagata, 2010). Neben der Funktion als calciumaktivierte Phospholipid-Scramblase scheint Anoctamin-6 auch einen Ionenkanal darzustellen, wobei bisher nicht eindeutig geklärt ist, ob Anoctamin-6 als calciumaktivierter Kationenkanal oder als Chloridkanal fungiert (Kunzelmann et al., 2016). Mutationen im Anoctamin-6-Gen führen über einen Defekt der Scramblaseaktivität zu einer gestörten Blutgerinnung und verursachen damit das Scott-Syndrom (Suzuki et al., 2013).

Anoctamin-5 wird in der Skelettmuskulatur und in der Schilddrüse exprimiert. So können Anoctamin-5-Mutationen zu Muskeldystrophien führen (Schreiber, Uliyakina, Kongsuphol et al., 2010; Silva, Coimbra-Neto, Souza et al., 2019).

4.2.4. HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden 1973 aus Nierenzellen eines abgetriebenen menschlichen weiblichen Embryos entwickelt. Daraus leitete sich der Name „Human Embryonic Kidney Cells“ ab, abgekürzt HEK293-Zellen oder HEK-Zellen oder 293-Zellen. Diese embryonalen Nierenzellen wurden mit gestückelter DNA des Genoms des Adenovirus 5 transfiziert (Graham, Smiley, Russell und Nairn, 1977). Das Genom des Adenovirus 5 wurde in das Chromosomen 19 integriert und enthält unter anderem die Gene für die Proteine E1A und E1B. E1A und E1B greifen in Kontrollpunkte des Zellzyklus ein und hemmen die Apoptose, wodurch die HEK293-Zelllinie immortalisiert wurde und eine andauernde Kultivierung möglich wurde (Malm, Saghaleyni, Lundqvist et al., 2020; Lin, Boone, Meuris et al., 2014).

HEK293-Zellen zeigen keine gewebespezifische Morphologie, die Ursprungsstruktur innerhalb der embryonalen Niere ist unbekannt. HEK-Zellen exprimieren Markergene von verschiedenen Zellen – aus Vorläuferzellen des Nierengewebes, aus Nervenzellen und aus Nebennierenzellen (Stepanenko und Dmitrenko, 2015). Analysen des Transkriptoms lassen die Hypothese zu, dass das Ursprungsgewebe von HEK293-Zellen embryonale Vorstufen der Nebenniere sein könnten (Lin et al., 2014).

Die Nutzung von HEK293-Zellen ist seit vielen Jahren weit verbreitet, sowohl in der Forschung als auch in der Biotechnologie. Sie sind eine der am weitest verbreiteten humanen Zelllinien, die zur Produktion rekombinanter Proteine, wie Antikörper, verwendet werden (Lin et al., 2014; Malm et al., 2020; Park, 2023). HEK-Zellen weisen eine schnelle Wachstumsrate sowie eine hohe Transfektionseffizienz auf und sind recht robust (Park, 2023). Beim Wachsen bilden sie einen konfluenten Monolayer aus länglichen Zellen (Park, 2023).

Die weit verbreitete Nutzung trägt mit dazu bei, dass sich das Genom kontinuierlich verändert. Es wurden verschiedene Karyotypen in den HEK-Zellen gefunden sowie eine große Diversität in der Chromosomenstruktur. Die American Type Culture Collection (ATCC) beschreibt den Karyotyp der HEK293-Zellen als hypotriploid. HEK-Zellen besitzen einige X-Chromosomen und keine Y-Chromosomen, sodass sie einem weiblichen Embryo entstammen müssen (Lin et al., 2014; Stepanenko und Dmitrenko, 2015). Die genetische Instabilität ist charakteristisch für immortalisierte Zelllinien und wird auch für CHO-Zellen beschrieben (Malm et al., 2020).

4.3. Bestrophin-1-Mutationen und Morbus Best

Das Bestrophin-1-Gen erlangte 1998 große Bedeutung, als es als verursachendes Gen für die Erkrankung Best'sche Vitelliforme Makuladystrophie (BVMD), auch bekannt als Morbus Best, identifiziert werden konnte (Marquardt, Stöhr, Passmore et al., 1998; Petrukhin, Koisti, Bakall et al., 1998).

4.3.1. Wo wird Bestrophin-1 exprimiert?

Das Bestrophin-1-Gen ist auf dem Chromosomen 11q12 – 11q13 lokalisiert und kodiert für das Protein Bestrophin-1, ein 585 Aminosäuren langes Transmembranprotein (Marquardt et al., 1998). Die höchste Expressionsrate weist Bestrophin-1 im Auge auf. Dort ist es ausschließlich im retinalen Pigmentepithel lokalisiert. Hier ist es einerseits in der basolateralen Zellemembran exprimiert (Marmorstein, Marmorstein, Rayborn et al., 2000b; Johnson et al., 2017; Reichhart, Milenkovic, Halsband et al., 2010; Johnson, Lee, Stanton et al., 2013) und auch intrazellulär, im endoplasmatischen Retikulum (Neussert, Müller, Milenkovic und Strauss, 2010; Barro-Soria, Aldehni, Almaça et al., 2010; Gómez, Tamm und Strauß, 2013).

Außerhalb des Auges scheint Bestrophin-1 auch in geringeren Mengen im Bronchialepithel lokalisiert zu sein (Barro-Soria et al., 2010), sowie im zentralen Nervensystem (Johnson et al., 2017). Jedoch wurde eine Proteinexpression von humanem Bestrophin-1 im zentralen Nervensystem bisher noch nicht nachgewiesen, lediglich der Nachweis von mRNA erfolgte (Johnson et al., 2017).

4.3.2. Funktionen von Bestrophin-1

Bestrophin-1 bildet ein Pentamer aus fünf identischen Bestrophin-1-Proteinen. Schon früh wurde es als Anionenkanal beschrieben, vornehmlich als Chloridkanal, der aber auch andere Anionen transportieren zu können scheint, wie Bicarbonat (Marmorstein, Johnson, Bachman et al., 2018; Hartzell, Qu, Yu et al., 2008), GABA und Glutamat (Johnson et al., 2017). Der Anionenkanal wird über Calcium- und Volumenänderungen reguliert (Marmorstein et al., 2018). Bestrophin-1 hat ebenfalls eine regulatorische Funktion auf das intrazelluläre Calciumsignalling (Marmorstein et al., 2018). Das Calciumsignalling beeinflusst Bestrophin-1 über die Interaktion mit L-Typ-Calciumkanälen und die Modulation deren Aktivität (Rosenthal, Bakall, Kinnick et al., 2006; Neussert et al., 2010). Cav1.3 (voltage-dependent Calcium channel) wird als der vorherrschende L-Typ-Calciumkanal im RPE angesehen (Reichhart et al., 2010). Über eine β -Untereinheit von Cav1.3 kann Bestrophin-1 mit Cav1.3 interagieren (Cordes, Bucichowski, Alfaar et al., 2020). Außerdem kann Bestrophin-1 das intrazelluläre Calciumsignalling modulieren, indem es die Aufnahme von Calcium in, sowie die Freisetzung von Calcium aus Calciumspeichern im

Endoplasmatischen Retikulum (ER) beeinflusst, möglicherweise indem es als Gegenion-Kanal fungiert (Barro-Soria et al., 2010; Neussert et al., 2010; Gómez, Tamm und Strauß, 2013). Das Calciumsignalling im ER ist für verschiedene Funktionen des RPE, wie den Flüssigkeitstransport oder die Phagozytose, wichtig (Singh, Shen, Kuai et al., 2013b).

Neben Bestrophin-1 gibt es noch drei weitere humane Bestrophinhomologe (Bestrophin-2, -3 und -4). Alle vier Bestrophinhomologe fungieren als calciumabhängige Anionenkanäle, unterscheiden sich aber in ihrer Gewebeexpression (Nachtigal, Milenkovic, Brandl et al., 2020). Neben der Bestrophin-1-Expression beim Menschen wurde in allen untersuchten Tieren Bestrophin-1 nachgewiesen und wird dort überall als Ionenkanal fungierend beschrieben (Johnson et al., 2017).

4.3.3. Mutationen im Bestrophin-1-Gen

Es sind über 250 verschiedene krankheitsverursachende Bestrophin-1-Mutationen bekannt (Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020). Der allergrößte Teil der Mutationen liegt in der N-terminalen Hälfte, die evolutionär hoch konserviert ist (Milenkovic et al., 2018). Insgesamt zeigt Bestrophin-1 eine recht hohe evolutionäre Konservierung auf, vor allem in den ersten 350 Aminosäuren (im N-terminale Bereich). Das C-terminale Ende weist mehr Unterschiede zwischen den Paralogen auf (Boon, Klevering, Leroy et al., 2009; Johnson et al., 2017).

Den größten Teil (etwa 90%) der Mutationen stellen Missense-Mutationen dar (Milenkovic et al., 2018). Die Missense-Mutationen sind in vier bestimmten Clustern/Mutationshotspots lokalisiert – zwischen Aminosäure (AS) 6 und 30, zwischen AS 80 und 104, zwischen AS 221 und 243 sowie zwischen AS 293 und 312. Demnach sind die für die Monographie erstellten Missense-Mutationen alle in beziehungsweise sehr nah dieser Mutationscluster lokalisiert (T6P, F80L, R218C, F305S) (Boon et al., 2009). Die für die Monographie erstellte Deletionsmutation (295del) stellt eine der wenigen Nicht-Missense-Mutationen dar (Boon et al., 2009; Milenkovic et al., 2011).

4.3.4. Pathophysiologie von Bestrophin-1-Mutationen

Die dem Morbus Best zugrunde liegenden Mutationen scheinen einen dominant-negativen Effekt zu haben (Boon et al., 2009; Milenkovic et al., 2018). Wahrscheinlich reicht schon eine mutante Bestrophin-1-Einheit im Pentamer aus, um die Funktion von Bestrophin-1 zu beeinträchtigen (Milenkovic, Brandl, Nachtigal et al., 2020).

Jede untersuchte krankheitsverursachende Bestrophin-1-Mutation führte zu einer gestörten Anionenkanalaktivität, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Johnson et al., 2017). Funktionsstörung von Ionenkanälen können gut untersucht werden mit Patch Clamp

Experimenten (Reichhart et al., 2010). Immunzytochemie-Experimente sind ungeeignet, Erkenntnisse zu direkten mutationsbedingten Funktionseinschränkungen von Ionenkanälen zu gewinnen. Dagegen können Immunzytochemie-Experimente Störungen im Proteintransport (Trafficking-Defekte) erfassen, was das Ziel der Experimente für diese Monographie war. Viele Mutationen in für Membranproteine codierenden Genen sind mit Trafficking-Defekten assoziiert (Milenkovic et al., 2011). Auch für Bestrophin-1-Mutationen sind in zahlreichen Studien Trafficking-Defekte beschrieben. Der Trafficking-Defekt kann durch Mutationen während fast der gesamten Länge des Bestrophin-1-Gens verursacht werden. Auch Mutationen im vorderen Teil der zytosolischen C-terminalen Region, wie bei F305S, können den Proteintransport beeinträchtigen. Nur der hintere Teil des C-Terminus scheint für den korrekten Proteintransport nicht so wichtig zu sein (Johnson et al., 2017).

Neben Störungen im Proteintransport und in der Kanalfunktion sind weitere Pathophysiologien bei Bestrophin-1-Mutationen beschrieben: So wird für einige Mutanten (beispielsweise für T6P, R218C und F305S) eine geringere Proteinstabilität beschrieben (Milenkovic et al., 2018). Auch ein gestörter Flüssigkeitstransport und ein verlangsamter Abbau der Fotorezeptoraußensegmente im retinalen Pigmentepithel wurde bei Bestrophin-1-Mutanten beschrieben (Singh et al., 2013b; Marmorstein et al., 2018; Singh, Kuai, Guziewicz et al., 2015). Der Calcium- und Wassertransport spielen eine wichtige Rolle in der Phagozytose im RPE. Dies erklärt, warum Mutationen im Bestrophin-1-Gen indirekt zu Störungen der Phagozytose führen können (Marmorstein et al., 2018). Die genannten Mechanismen schränken bei Bestrophin-1-Mutationen die Funktion des RPE ein und führen dementsprechend zu einer Degeneration der Fotorezeptoren (Neusser et al., 2010). Eine mutationsbedingte Störung der Oligomerisation zu Pentameren scheint dagegen unwahrscheinlich (Johnson et al., 2017).

Bisher konnte noch keine eindeutige Korrelation zwischen dem Genotyp und der phänotypischen Ausprägung des Morbus Best gezeigt werden (Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020; Renner, Tillack, Kraus et al., 2005).

4.3.5. Erkrankungen ausgelöst durch Bestrophin-1-Mutationen

Die Best'sche Vitellforme Makuladystrophie, auch bekannt als Morbus Best, stellt die häufigste Erkrankung innerhalb der Bestrophinopathien dar (Milenkovic et al., 2018). Die Schätzungen zur Prävalenz sind in der Literatur sehr heterogen (Nachtigal et al., 2020; Bitner, Schatz, Mizrahi-Meissonnier et al., 2012; Nordström, 1974)), ein regelmäßig auftretendes Problem bei seltenen Erkrankungen. Mit einer Prävalenz von etwa 1:50 000 (Milenkovic et al., 2018) stellt der Morbus Best eine seltene Erkrankung dar. Neben Morbus Best zählen auch die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC), die adulte vitelliforme Makuladystrophie (AVMD, eine

Musterdystrophie), die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (ARB) und die Retinitis Pigmentosa zu den Bestrophinopathien (Johnson et al., 2017). Während die Retinitis Pigmentosa auch durch Mutationen in anderen Genen verursacht werden kann, sind alle anderen Bestrophinopathien monogenetisch vererbte Erkrankungen, durch Mutationen im Bestrophin-1-Gen verursacht (Milenkovic et al., 2020). Die Bestrophinopathien unterscheiden sich anhand ihrer klinischen Manifestation und anhand ihrer Vererbung.

Während Morbus Best, die autosomal-dominante Vitreoretinochoroidopathie und die adulte vitelliforme Makuladystrophie autosomal-dominant vererbt werden, wird die autosomal-rezessive Bestrophinopathie autosomal rezessiv vererbt. Für die Retinitis Pigmentosa sind sowohl autosomal-dominante als auch autosomal-rezessive Mutationen beschrieben. Die AVMD tritt auch oft sporadisch auf (Boon et al., 2009).

Es besteht eine große intra- und interfamiliäre Variabilität im Phänotyp des Morbus Best (Nachtigal et al., 2020). Dieselben Bestrophin-1-Mutationen können zu sehr variablen phänotypischen Ausprägungen des Morbus Best führen, die Ursachen dafür sind bisher unbekannt. Zudem zeigen die Mutationen eine variable Expressivität und Penetranz (Boon et al., 2009). Morbus Best betrifft vor allem die zentrale Retina (Milenkovic et al., 2011; Nachtigal et al., 2020). Klinisch ist ein in Stadien erfolgender Verlauf typisch, beginnend mit der namensgebenden vitelliformen („eigelartigen“) Makulaveränderung. Eine leichte Visusminderung ist möglich im vitelliformen Stadium, welches oft in der ersten oder zweiten Lebensdekade beginnt. Anschließend kommt es zur Resorption der vitelliformen Läsion, was dann den Eindruck eines Pseudohypopions machen kann und später zur Ruptur der Läsion. In diesem sogenannten vitelliruptiven Stadium kann der Visus deutlich abfallen (Johnson et al., 2017; Milenkovic et al., 2020). Der Verlauf gestaltet sich jedoch heterogen, 7-9% der Betroffenen weisen keine Visuseinschränkungen auf (Johnson et al., 2017). Obwohl Bestrophin-1 auch außerhalb des Auges exprimiert wird, betreffen mutationsbedingte Krankheitssymptome ausschließlich die Augen (Marmorstein et al., 2018; Johnson et al., 2017).

Typisch für den Morbus Best ist ein deutlich reduzierter Lichtpeak im Elektrokulogramm, abgekürzt EOG. Während der Arden-Quotient im EOG (Quotient aus Lichtpeak zu Dunkelminimum) physiologisch bei > 2 liegt, ist er beim Morbus Best auf $< 1,55$ reduziert. Das EOG kann initial auch normal sein oder selten sogar im Verlauf normal bleiben (Boon et al., 2009; Johnson et al., 2017). Das Elektorretinogramm (ERG) ist dagegen normal (Johnson et al., 2017). Die Fundusautofluoreszenz, die Nah-Infrarot-Autofluoreszenz und die optische Kohärenztomografie (OCT) können für die Verdachtsdiagnose und für Differentialdiagnosen hilfreich sein (Milenkovic et al., 2020), jedoch werden die genetischen Tests als verlässlicher eingestuft und sollten zur Diagnosebestätigung eingesetzt werden (Johnson et al., 2017). Ob der

physiologische Lichtpeak im EOG durch Bestrophin-1 oder durch andere Ionenkanäle verursacht wird, wie möglicherweise durch Ionenkanäle der Anoctamin-Familie (Boon et al., 2009), ist bisher nicht abschließend geklärt.

4.3.6. Das iPSC-RPE-Zellmodell für Bestrophin-1-Mutationen

Es existieren verschiedene in-vitro-RPE-Zellmodelle neben dem Modell aus induziert pluripotenten Stammzellen (induced pluripotent stem cells, iPSC). So können RPE-Zellkulturen aus Spendergewebe hergestellt werden oder immortalisierte Zelllinien wie die ARPE-19-Zellen (adulte retinale Pigmentepithelzellen, spontan immortalisierte Zelllinie eines 19-jährigen Mannes) verwendet werden. Immortalisierte Zellen weisen im Vergleich zu den iPSC-RPE mehr Einschränkungen in der Ausbildung von in-vivo-Charakteristika auf (Hazim, Karumbayaram, Jiang et al., 2017). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen humanen iPSC-RPE und humanen fetalen RPE-Zellen bezüglich der Zellmorphologie, der Pigmentierung, der Gen- und Proteinexpression oder der Polarität (Singh, Phillips, Kuai et al., 2013a). Humanes fetales Gewebe hat jedoch einige Limitationen wie eine begrenzte Verfügbarkeit (Hazim et al., 2017). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen besitzen iPSC-RPE den Vorteil, dass sie ethisch weniger problematisch sind und immunologisch komplikationsärmer sind (Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011). Dies waren wichtige Gründe zur Wahl des iPSC-RPE-Zellmodells.

Bei Singh et al. schienen Bestrophin-1-Mutationen wichtige Charakteristika der iPSC-RPE-Zellen wie das Zellkulturwachstum, die Zellmorphologie, die Gen- und Proteinexpression oder die Bildung der Tight Junctions nicht zu beeinflussen (Singh et al., 2013b).

iPSC können hergestellt werden, indem Fibroblasten reprogrammiert werden. Das Einbringen von Dedifferenzierungsfaktoren erfolgte ursprünglich über Lenti- oder Retroviren (Singh et al., 2013a) und ist inzwischen auch ohne virale Vektoren möglich (Hazim et al., 2017; Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011). Anschließend können die iPSC zu verschiedenen Geweben differenziert werden. Die Differenzierung der iPSC zu iPSC-RPE ist ein mehrere Wochen dauernder Prozess (Singh et al., 2013b; Zhu, Carido, Meinhardt et al., 2013) und erfolgt durch den Einsatz eines speziellen Differenzierungsmediums und in Zellkulturbehältnissen, deren Oberflächen gecoatet (überzogen) sind. Das Coaten kann beispielsweise mit Laminin (Singh et al., 2013a; Hazim et al., 2017) oder mit Matrigel (Lin, Gil und Yoder, 2017; Zhu et al., 2013) erfolgen.

Während des Differenzierungsprozesses nimmt die Expression von Pluripotenzfaktoren ab (Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011; Singh et al., 2013a), die Zellen werden zunehmend pigmentierter und exprimieren zunehmend RPE-Markerproteine wie Bestrophin-1, RPE65 (ein

Protein, das für das Recycling von Retinoid benötigt wird) oder MITF (Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor, bedeutend in der Melaninsynthese) (Hazim et al., 2017; Singh et al., 2013a; Carr, Vugler, Hikita et al., 2009; Zhu et al., 2013). Dadurch kann an iPSC-RPE das Verhalten von endogenen Bestrophin-1-Mutanten sowie der Effekt von transfizierten Bestrophin-1-Mutationen auf den endogen exprimierten Bestrophin-1-Wildtyp untersucht werden.

Neben der Expression von RPE-Markerproteinen weisen iPSC-RPE auch weitere RPE-Charakteristika und -Funktionen auf, was sie zur Forschung von Retinaerkrankungen wie dem Morbus Best attraktiv macht. So exprimieren sie Tight Junction Proteine wie ZO-1 (Zonula occludens 1), Occludin und Claudin-19. Mit der Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands kann die Funktion der Tight Junctions und die Fähigkeit zur Ausbildung einer intakten Schranke (wie sie die Blut-Retina-Schranke in vivo darstellt) überprüft werden. Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstand stellt eine Qualitätskontrolle der iPSC-RPE dar (Hazim et al., 2017; Singh et al., 2013a; Zhu et al., 2013) und erfolgte vor der Verwendung der iPSC-RPE im Herstellerlabor. Weiterhin wurde gezeigt, dass iPSC-RPE Fotorezeptoraußensegmente phagozytieren und abbauen können – eine wichtige Funktion des RPE in vivo (Singh et al., 2013a; Zhu et al., 2013), welche beim Morbus Best eingeschränkt ist (Singh et al., 2013b; Marmorstein et al., 2018; Singh et al., 2015). Auch besitzen iPSC-RPE eine Polarität (Singh et al., 2013a; Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011) – ein wichtiges Charakteristikum aufgrund der basolateralen Expression von Bestrophin-1 in vivo.

iPSC-RPE haben eine ähnliche Morphologie wie RPE-Zellen. Sie bilden einen konfluenten Monolayer, der typischerweise ein pflastersteinartiges Aussehen („cobblestone“) hat. Die Morphologie der einzelnen Zellen wird als hexagonal oder kubisch beschrieben (Hazim et al., 2017; Singh et al., 2013a; Grisanti und Guidry, 1995).

iPSC-RPE zeigen jedoch während der Kultivierung und mit zunehmender Passage eine schnelle Alterung – eine rapide Verkürzung der Telomere, eine zunehmende Expression des Tumorsuppressorgens p21 und DNA-Schäden konnte die Arbeitsgruppe um Kokkinaki nachweisen. Diese Änderungen führen zu einer Hemmung des Zellwachstums (Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass nach einer gewissen Anzahl an Passagen (je nach Studie nach 3 bis 7 Passagen) das Zellwachstum abnimmt, sich die Zellen morphologisch ändern und die funktionellen Charakteristika von RPE-Zellen verlieren. Die Zellen entwickeln dann eine fibroblastenartige Morphologie (Grisanti und Guidry, 1995; Singh et al., 2013a; Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011; Buchholz, Hikita, Rowland et al., 2009).

4.4. Hintergrund zu den weiteren antigenen Strukturen für die immunzytochemischen Färbungen

4.4.1. Pan-Cadherin und β -Catenin als Zellmembranmarker

Die Antikörper gegen Pan-Cadherin und gegen β -Catenin dienen in der Immunzytochemie als Zellmembranmarker. Cadherine und Catenine sind Zelladhäsionsproteine, die maßgeblich am Aufbau von Anchoring Junctions (Ankerverbindungen) beteiligt sind. Zu den Anchoring Junctions gehören Adherens Junctions (Adhärenzverbindungen) und Desmosomen. Sie vermitteln und stabilisieren Zell-Zell-Kontakte (Tian, Liu, Niu et al., 2011).

Cadherine sind eine große Familie von Transmembranproteinen. Calciumabhängig vermitteln sie eine Zelladhäsion zwischen zwei Zellen, indem die extrazellulären Regionen zweier Cadherine miteinander als Homodimer interagieren. Zu den klassischen Cadherinen gehören E-Cadherine (epithelial), N-Cadherine (neuronal) und VE-Cadherine (vaskulär-endothelial), die in diesen entsprechenden Geweben jeweils Adherens Junctions bilden (Tian et al., 2011). Der verwendete Antikörper Anti-Pan-Cadherin kann verschiedene Cadherine in der Zellmembran binden und dient in den HEK293-Zellen als Zellmembranmarker.

Das intrazelluläre Ende der transmembranen Cadherine interagiert mit Cateninen und anderen Regulatorproteinen. Zu den Cateninen gehört unter anderem β -Catenin, das über Alpha-Catenin an das Aktin-Zytoskelett binden kann, wodurch mechanisch stabile Zell-Zellverbindungen in Form von Adherens Junctions gebildet werden (Tian et al., 2011; Gumbiner, 2005). Der Anti- β -Catenin-Antikörper dient als Zellmembranmarker in den immunzytochemischen Färbungen der iPS-RPE-Zellen. Neben der Verbindung von Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett weisen Catenine weitere Funktionen auf – so können sie indirekt das Aktin-Zytoskelett regulieren sowie die Adhäsion von Cadherinen regulieren (Gumbiner, 2005).

Cadherin-Catenin-Komplexe erfüllen neben ihrer Rolle in der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, einige weitere Funktionen. So sind sie in der Signaltransduktion involviert, wie beispielsweise im Wnt-Signalweg. Weiterhin sind Cadherin-Catenin-Komplexe von Bedeutung in der Epithelial-mesenchymalen Transition und in der Mesenchymal-epithelialen Transition, was wichtige Prozesse in der Embryogenese, in der Fibrosierung, und auch in der Tumorentwicklung sind (Tian et al., 2011; Gumbiner, 2005).

4.4.2. Das endolysosomale System

Mit der Verwendung von Antikörpern gegen Lamp1 (lysosome-associated membrane protein 1, Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1) und EEA1 (early endosome antigen 1, Antigen der

frühen Endosomen) kann die intrazelluläre Lokalisation mutanter Anoctamine und Bestrophine in Bezug zum endolysosomalen System untersucht werden.

Die Oberflächenexpression von Ionenkanälen kann quantitativ zum einen über die Gen-/Proteinexpression reguliert werden und zum anderen über das Turnover – die Endozytose von Ionenkanälen mit anschließendem Abbau oder Recycling der Ionenkanäle (Estadella, Pedrós-Gámez, Colomer-Molera et al., 2020). Das Zusammenspiel aus Sekretion, Endozytose und Abbau bzw. Recycling der Ionenkanäle ist fein reguliert (Estadella et al., 2020). Nach der Endozytose fusionieren die mit den Ionenkanälen beladenen Vesikel mit den frühen Endosomen (Estadella et al., 2020; Naslavsky und Caplan, 2018). Frühe Endosomen stellen eine Sortierstation dar: Proteine gelangen entweder über die späten Endosomen zu den Lysosomen zum Abbau (endolysosomaler Weg) oder es erfolgte ein Recycling und Rücktransport zur Plasmamembran (Naslavsky und Caplan, 2018).

Das Recycling von Proteinen erfolgt über zwei Mechanismen: der schnelle Recycling-Weg mit direktem Vesikeltransport der Proteine vom frühen Endosom zur Plasmamembran oder über den langsamen Recycling-Weg über Recycling-Endosomen (Estadella et al., 2020; Naslavsky und Caplan, 2018).

Frühe Endosomen haben einen pH-Wert von etwa 6,2, der durch eine Vakuoläre H⁺-ATPase erzeugt wird. Sie sind dynamische Strukturen durch ein kontinuierliches Fusionieren und Abschnüren von Vesikeln (Naslavsky und Caplan, 2018). Es ist nicht klar, ob Vesikel vom frühen Endosom abgeschnürt werden und dann mit dem späten Endosom fusionieren oder ob frühe Endosomen zu späten Endosomen „heranreifen“. Späte Endosomen haben einen geringeren pH-Wert als frühe Endosomen und sie ähneln funktionell mehr den Lysosomen als den frühen Endosomen. In der Literatur gibt es heterogene Ansichten, ob späte Endosomen eher eine Subpopulation der Lysosomen darstellen oder eine weiter gereifte Form der frühen Endosomen (Naslavsky und Caplan, 2018).

Lysosomen haben einen pH-Wert zwischen 4,5 und 5,0, der ebenfalls durch Vakuoläre H⁺-ATPasen erzeugt wird. Der saure pH-Wert ist wichtig für die hydrolytischen Enzyme, die Ionenkanäle und andere Proteine in den Lysosomen degradieren (Bouhamdani, Comeau und Turcotte, 2021). Lysosomen üben neben dem Proteinabbau aber auch Funktionen über Exozytose aus – sie sind beteiligt in der Reparatur der Plasmamembran, im Zell-Signalling, in der Präsentation von Antigenen, beim Remodelling von Geweben oder bei der Resorption von Knochengewebe (Saftig und Klumperman, 2009; Barral, Staiano, Guimas Almeida et al., 2022).

Dass die adäquate Regulation des Turnovers wichtig ist, zeigen Krankheitsbilder wie das Liddle-Syndrom oder das Long-QT-Syndrom (Estadella et al., 2020). Beim Liddle-Syndrom liegt eine

Mutation im epithelialen Natriumkanal (eNaC) vor, wodurch die Ubiquitinierung und infolgedessen der proteosomale Abbau von eNaC gestört wird. Das führt zur verstärkten Natrium- und Wasserrückresorption in den Sammelrohren Nieren und zur Ausbildung einer arteriellen Hypertonie. Das Long-QT-Syndrom kann genetisch bedingt (durch Mutationen in kardialen Natrium-, Kalium- oder Calciumkanälen) oder erworben sein, am häufigsten als Medikamentennebenwirkung (unter anderem bei Antidepressiva, Antibiotika, Antiarrhythmika). Die Verlängerung der QT-Zeit birgt die Gefahr der Entwicklung von Herzrhythmusstörungen wie Torsade-de-Pointes-Tachykardien. (Wilde und Amin, 2018; Priori, Blomström-Lundqvist, Mazzanti et al., 2015). Sowohl das Liddle-Syndrom als auch das Long-QT-Syndrom gehören jeweils zu den Channelopathies (Estadella et al., 2020).

4.4.2.1. Bestrophin-1 im endolysosomalen System

Bestrophin-1 wurde bereits im endolysosomalen System untersucht. Milenkovic schlägt die Lysosomen als Abbauort mutanter Bestrophine bei den autosomal-dominant-vererbten Bestrophinopathien vor: sie werden nicht von den zelleigenen Chaperonen (Faltungshelfermoleküle) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erkannt, sondern stattdessen werden sie im Qualitätskontrollsystem des Golgi-Apparates als inkorrekt erkannt und anschließend im endolysosomalen System abgebaut (Milenkovic et al., 2020). Morbus Best-Mutanten zeigten eine erhöhte Expressionsrate nach Inkubation mit dem Lysosom-Inhibitor Chloroquin – dies zeigt, dass autosomal dominant vererbte Bestrophin-1-Mutationen zu einem lysosomalen Abbau der mutanten Proteine führen (Nachtigal et al., 2020). Dagegen werden mutante Bestrophin-1-Proteine bei der autosomal-rezessiv vererbten Bestrophinopathie von Chaperonen im ER erkannt und anschließend in Proteasomen abgebaut (Milenkovic et al., 2020).

In iPSC-RPE von Morbus Best betroffenen Personen konnte eine verstärkte Proteinoxidierung und verminderte Level an freiem Ubiquitin beobachtet werden, welche durch eine Dysfunktion und Überstrapazierung des endolysosomalen Abbauweges bedingt sein könnten (Singh et al., 2015).

Es wurden hohe Turnoverraten für Bestrophin-1-Mutanten in MDCK-II-Zellen (eine Zelllinie aus Nierengewebe eines Hundes, englisch Madin-Darby canine kidney cells) beschrieben (Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020).

4.4.3. Caspase 3

Caspasen sind eine Familie aus Proteasen, die eine zentrale Rolle in der Apoptose spielen – ein programmierter und kontrollierter Zelltod einzelner Zellen. Die Apoptose kann durch extrinsische (durch Bindung von Liganden an sogenannte „Todesrezeptoren“) und intrinsische Signale (durch

DNA-Schäden, oxidativen Stress, ER-Stress oder Nährstoffmangel) induziert werden. Die Apoptosesignale führen zur Aktivierung der Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10). Diese spalten und aktivieren die Effektorcaspasen, zu denen neben Caspase 6 und 7 auch Caspase 3 zählt. Die Effektorcaspasen initiieren den Abbau zellulärer Strukturen, sowie die DNA-Degradierung, die Zellkernschrumpfung (Pyknose) und die Chromatin-Fragmentierung (Karyorrhesis). Aktivierte Caspase 3 (cleaved Caspase 3) dient in der Immunzytochemie als Marker für apoptotische Zellen (Kesavardhana, Malireddi und Kanneganti, 2020; Silva, Padín-Iruegas, Caponio et al., 2022).

4.5. Natriumphenylbutyrat als Chaperon

Natriumphenylbutyrat (Sodium 4-Phenylbutyrate, 4PBA) kann als Chaperon (Faltungshelfermolekül) fungieren, indem es an hydrophobe Regionen von fehlgefalteten Proteinen bindet und die korrekte Faltung dieser Proteine unterstützt (Gioia, Tonelli, Ceppi et al., 2017). Natriumphenylbutyrat ist bereits als Wirkstoff zugelassen in der Behandlung von Stoffwechselstörungen im Harnstoffzyklus.

5. Fragestellungen

Die immunzytochemischen Experimente sollten das zelluläre Verhalten von Anoctamin-4-Mutanten – als Ursache für verschiedene Epilepsien – und von Bestrophin-1-Mutanten – als Ursache für das Krankheitsbild des Morbus Best – genauer charakterisieren, um deren Pathophysiologie besser zu verstehen. Ein genaues Verständnis der Pathophysiologie ist von großer Bedeutung, um langfristig mögliche Therapieansätze für diese genetischen Erkrankungen zu entwickeln. Die Immunzytochemischen Experimente dienen der Annäherung an folgende konkrete Fragestellungen:

5.1. Fragestellungen zu Anoctamin-4

Wie gestaltet sich das zelluläre Verhalten Anoctamin-4 bei immunzytochemischen Färbungen an HEK293-Zellen – wie hoch ist deren Anteil in der Zellmembran und besteht auch eine Assoziation zu intrazellulären Organellen wie dem frühen Endosom und Lysosomen? Wie verhalten sich mutante Anoctamin-4-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Anoctamin-4? Welche Auswirkung hat die Applikation von Natriumphenylbutyrat auf das zelluläre Verhalten mutanter Anoctamin-4-Proteine? Zeigen mit Anoctamin-4-Mutanten transfizierte HEK-Zellen eine erhöhte Apoptoserate?

5.2. Fragestellungen zu Bestrophin-1

Wie unterscheidet sich das zelluläre Verhalten von Bestrophin-1-Proteinen in iPSC-RPE-Zellen mit Mutationen im Bestrophin-1-Gen (endogene Mutation und transfizierte Mutationen) von mit Wildtyp-Bestrophin-1 transfizierten iPSC-RPE? Welche Auswirkung hat die Applikation von Natriumphenylbutyrat auf das zelluläre Verhalten mutanter Bestrophin-1-Proteine?

6. Materialien und ihre Bezugsquellen

6.1. Geräte / Software und Hersteller (Tabelle 1)

Gerät / Software	Hersteller
Autoklav Systemec VE-75	Systemec, Wettenberg, Deutschland
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Confocal Microscope SPE Leica (Mikroskop CCM)	Leica SPE, Wetzlar, Deutschland
Heracell 150i CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
ImageJ Software	U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
iCycler PCR-Gerät	Bio-Rad, München, Deutschland
Megafuge 1.0R Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Nano-Drop2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Orbital Incubator S150 Stuart	Cole-Parmer, Cambridgeshire, Großbritannien
Zeiss Imager.M2 (Mikroskop CVK)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zeiss LSM 510 Confocal Microscope (Mikroskop CBF)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

6.2. Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2)

Materiealien	Hersteller
Coverslips 12mm (für HEK-Zellen)	Epredia, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Dako Pen	Dako Denmark, Glostrup Dänemark

Polypropylene Round-Bottom Tube 14ml	Falcon®, Corning Science México, Tamaulipas, Mexico
Sterilfilter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Transwell Permeable Supports Costar (6,5mm Insert, 24 Well Plate, 0,4µm Polyester Membrane), für iPS-RPE-Zellen	Corning, Corning, USA
24er Well-Platte (24 Well Tissue Culture Plate)	Falcon® A Corning Brand, Corning, USA
Zellkulturflasche (VWR Tissue Culture Flask)	VWR, Radnor, USA

6.3. Reagenzien (Tabelle 3)

Reagenz	Hersteller, Ortsangabe
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Bovines Serumalbumin (bovine serum albumin, BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland (Tochterunternehmen von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol), 50mM	gibco, Karlsruhe, Deutschland
Cobalt-II-Chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland (Tochterunternehmen von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
DAPI (direkt, interkalierender Fluoreszenzfarbstoff: 4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland (Tochterunternehmen von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
DMEM+Glutamax (mit 1g/l D-Glukose und 110mg/l sodium Pyruvate)	gibco, Karlsruhe, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Teil von Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
HAM's F12	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland

Kanamycinsulfat	Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Knockout Serum Replacement	gibco, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar-Kanamycin (LB-Agar (Luria/Miller) / Kana50)	Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar-Ampicillin (LB-Agar (Luria/Miller) Amp100)	Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller; 10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl, pH7,0)	Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamine-solution (L-GLU 200mM) (L-Alanyl-L-Glutamine)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland (Tochterunternehmen von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Life Technologies Corporation, Oregon, USA
Matrigel	Corning, Corning, USA
Non-Essential Amino Acid (MEM NEAA 10x)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM (1x)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd, PFA	Electron Microscopy Science, Hatfield, USA
PBS (phosphate-buffered saline, Dulbecco's phosphate-buffered saline)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Biochrom, Teil von Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Poly-L-lysine hydrobromide	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA (europäischer Support in Heidelberg, Deutschland)
Natriumphanylbutyrat (4PBA)	Caymann Chemicals. Item: 12193
Triton x-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland (Tochterunternehmen von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Trypsin-EDTA 0,05%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserstoffperoxid	Acros Organics, Teil von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

6.4. Zelllinien

HEK293-Zellen: CRL-1573; ATCC, Wesel, Deutschland

iPS-RPE-Zellen mit Wildtyp-Bestrophin-1 (eines gesunden Spenders): CRTDi004-A

(vom Center for Molecular and Cellular Bioengineering (CMCB) der TU Dresden)

iPS-RPE-Zellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (eines männlichen Patienten mit Morbus Best und Bestrophin-1-Mutation D302A): iPS-Zelllinie von Stephan Tsang (New York, Columbia University) nach Dresden geliefert, durch die Gruppe von Prof. Dr. Marius Ader am Zentrum für Regenerative Therapien Dresden (CRTD) in RPE-Zellen differenziert.

6.5.1. Hergestellte Puffer, Lösungen und Medien

6.5.1.1. Zellkultur

Kulturmedium für HEK293-Zellen:

DMEM+Glutamax + 10% Fötale Rinderserum (FBS) + 1% Penicillin-Streptomycin

Kulturmedium für iPS-RPE-Zellen (RPE-Medium):

200ml DMEM+Glutamax + 50ml Knockout Serum Replacement + 2,5ml Non-Essential Amino Acid + 5ml L-Glutamine-solution + 7µl 50mM β-Mercaptoethanol

6.5.1.2. Mutagenese und Plasmidvermehrung

SOB-Medium für Transformation in competent cells und supercompetent cells

1 Liter destilliertes Wasser + 20g Trypton + 5g Hefeextrakt + 0,5g Natriumchlorid. Nach dem Autoklavieren 10ml filtersterilisiertes 1M Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) und 10ml filtersterilisiertes 1M Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) hinzufügen.

SOC-Medium (erst direkt vor der Nutzung herzustellen):

1ml SOB-Medium + 10µl filtersterilisierte 2M Glukose

LB-Medium-Ampicillin (zur Plasmidvermehrung der Anoctamin-4-Plasmide):

100ml destilliertes Wasser + 2,5g LB-Medium. Autoklavieren. Nach dem Abkühlen Hinzufügen von Ampicillin, sodass die finale Konzentration bei 100µg/ml LB-Medium liegt (für 100ml LB-Medium wurden 100µl der 100mg/ml konzentrierten Ampicillin-Lösung benötigt).

LB-Medium-Kanamycin (zur Plasmidvermehrung der Bestrophin-1-Plasmide):

100ml destilliertes Wasser + 2,5g LB-Medium + 0,005g Kanamycinsulfat. Autoklavieren.

LB-Ampicillin-Agarplatten (zum Aussäen der Anoctamin-4-Klone):

200ml destilliertes Wasser + 8g LB-Ampicillin-Agar. Für 1min kochen lassen in der Mikrowelle (nicht autoklavieren). Gießen der Agarplatten.

LB-Kanamycin-Agarplatten (zum Aussäen der Bestrophin-1-Klone):

200ml destilliertes Wasser + 8g LB-Kanamycin-Agar. Autoklavieren. Gießen der Agarplatten.

6.5.1.3. Vorbereitung zur Immunzytochemie

Coating der Coverslips für HEK293-Zellen:

Poly-L-lysine hydrobromide-Lösung: Destilliertes Wasser + 0,01% (Sample 1 – 2) bzw. 0,005% (ab Sample 3) Poly-L-Lysin + 1% Penicillin-Streptomycin

Coating der Filter für iPS-RPE-Zellen:

Matrigel 1:20 verdünnt mit RPE-Medium

6.5.1.4. Versuche vor Immunzytochemie-Färbung

Natriumphénylbutyrat (Sodium 4-Phenylbutyrate, Na⁺-4PBA, 4PBA): 2,5mM 4PBA in HEK-Medium bzw. iPSC-RPE-Medium

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für anti-cleaved Caspase-3-Versuch: Verwendung verschiedener Konzentrationen (zwischen 1µmol/l und 1mmol/l) H₂O₂, jeweils in PBS-Medium verdünnt

Cobalt-II-Chlorid für anti-cleaved Caspase-3-Versuch: 1200µM-Vorratslösung, Verwendung von 15µl Cobalt auf 285µl Medium (für eine Konzentration von 600µM Cobalt) oder Verwendung von 7,5µl Cobalt auf 292,5µl Medium (für eine Konzentration von 600µM Cobalt)

6.5.1.5. Immunzytochemie

TBS-Puffer (Tris-buffered saline-Puffer):

für 10x-TBS-Puffer: 24g Tris-Säure (TrisHCl, Tris-Hydrochlorid) + 5,6g Tris-Base (TrisNaOH, Tris(hydroxymethyl)-methylamine) + 88g Natriumchlorid auf 1 Liter destilliertes Wasser aufgefüllt, auf pH 7,6 eingestellt mithilfe von Salzsäure

Nutzung von 1x-TBS-Puffer für Immunzytochemie (10x-Puffer 1:10 verdünnt)

4% PFA (Paraformaldehyd): 16% PFA-Lösung 1:4 verdünnt mit destilliertem Wasser

Triton X-100 (zum Permeabilisieren der Zellen): 100%iges Triton X-100 verdünnt mit 1x-TBS-Puffer auf 0,5% Triton X-100 (Verdünnung 1:200, für reguläre Färbungen) bzw. auf 1% Triton X-100 (Verdünnung 1:100, für Caspase-3-Färbung)

Bovines Serumalbumin (BSA) (zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen): 50ml 1x-TBS-Puffer und 2,5g BSA (Konzentration von 5% BSA)

DAPI (direkt, interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidin-2-phenylindol)): 3mM stock solution (Vorratslösung) auf 300 nM working solution (Arbeitslösung) verdünnt mit 1x-TBS-Puffer

6.6. Kits und Hersteller (Tabelle 4)

Kit	Hersteller, Ortsangabe, Katalognummer
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande. Cat # 12162, 12163, 12165
Qiagen Plasmid Plus Midi-Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande. Cat # 12943 und 12945
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande. Cat # 27106
QuickChange XL1-Blue Competent Cells	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA. Cat # 200249
QuickChange XL1-Blue Supercompetent Cells	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA. Cat # 200519-4
Site-directed mutagenesis kit	Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA. Cat # 200519-5

7. Methodik

7.1. Erzeugen der gewünschten Mutationen

7.1.1. Nomenklatur der einzelnen Mutationen

Es gibt spezifische Empfehlungen zur Nomenklatur von Genvarianten und Mutationssequenzen (den Dunnen, Dagleish, Maglott et al., 2016). So kann die Mutation innerhalb der Proteinsequenz beschrieben werden (beispielsweise p.Asn129Lys) oder auch innerhalb der Nukleotidsequenz angegeben werden (c.387C>G). Während die Nukleotidsequenz eindeutig anzeigt, welche Basen betroffen sind (bei der Substitutionsmutation c.387C>G wird Cytosin zu Guanin), beschreibt die Proteinsequenz die Auswirkungen auf der Ebene der Aminosäuren (bei p.Asn129Lys wird Asparagin zu Lysin).

Bezeichnung in Monographie	Nukleotidsequenz	Proteinsequenz	Abgekürzte Proteinsequenz	Ausgetauschte Aminosäuren
c387g	c.387C>G	p.Asn129Lys	N129K	Asparagin > Lysin
g1582a	c.1582G>A	p.Val528Met	V528	Valin > Methionin
c1674g	c.1674C>G	p.Asn558Lys	N558K	Asparagin > Lysin
a1684t	c.1684A>T	p.Ile562Phe	I562F	Isoleucin > Phenylalanin
t1688a	c.1688T>A	p.Met563Lys	M563K	Methionin > Lysin
a1807g	c.1807A>G	p.Asn603Asp	N603D	Asparagin > Asparaginsäure
t2147c	c.2147T>C			
t2174c	c.2174T>C	p-Ile725Thr	I725T	Isoleucin > Threonin

Tabelle 5: Nomenklatur der hergestellten Anoctamin-4-Mutationen

In der Tabelle 5 sind die Möglichkeiten dargestellt, wie die hergestellten Anoctamin-4-Mutationen bezeichnet werden können und welche Aminosäuren mutationsbedingt substituiert werden. Die in der Monographie verwendeten Bezeichnungen (ganz linke Spalte) decken sich nicht ganz mit den Empfehlungen der Human Genome Variation Society (den Dunnen et al., 2016). Aus diesem Grund ist die korrekte Bezeichnung der Nukleotidsequenz in der zweiten Spalte von links aufgeführt. Die verwendete Bezeichnung (c387g etc.) hat sich im Labor etabliert, da sie einfacher und flüssiger auszusprechen ist und wird deshalb in der Textform dieser Monographie beibehalten.

Die Auswahl fiel auf Mutationen, zu denen es jeweils klinische Falldaten gibt (Anoctamin-4) beziehungsweise die in Mutations-Hotspots liegen (Bestrophin-1), um konkret Mutationsauswirkungen in vivo und in vitro vergleichen zu können.

Für alle Anoctamin-4-Mutationen mit Ausnahme von t2147c existieren Fälle von Patienten/Patientinnen mit verschiedenen Epilepsieformen, weshalb die Auswahl auf diese Mutationen fiel. Für die Mutation t2147c sind bisher noch keine Epilepsien beschrieben. Statt der Mutation t2147c hätte eigentlich die Mutation t2174c hergestellt werden sollen, da zur Mutation t2174c Falldaten einer Temporallappenepilepsie vorliegen (Yang et al., eingereicht). Jedoch

wurde der unterlaufene Fehler durch einen Zahlendreher erst nach Durchführung der gesamten Experimente auffällig. Deshalb werden die gewonnenen Erkenntnisse zur Mutation t2147c in der Monographie mit dargestellt. Die immunzytochemischen Färbungen zur Mutation t2174c wurden durch eine andere Person durchgeführt (Fang Yang) und werden deshalb nicht in dieser Monographie aufgeführt.

Bezeichnung in Monographie	Nukleotidsequenz	Proteinsequenz	Ausgetauschte Aminosäuren
T6P	c.16A>C	p.Thr6Pro	Threonin > Prolin
F80L	c.240C>A	p.Phe80Leu	Phenylalanin > Leucin
R218C	c.652C>T	p.Arg218Cys	Arginin > Cystein
F305S	c.914T>C	p.Phe305Ser	Phenylalanin > Serin
295del	c.884_886del	p.Ile295del	Deletion von Isoleucin

Tabelle 6: Nomenklatur der hergestellten Bestrophin-1-Mutationen

7.1.2. Plasmide als Ausgangs-DNA

Plasmid für Anoctamin-4:

Das Plasmid „pcDNA3.1 (+) c-Myc-tec“ ist 5493 Basenpaare lang und enthält das Gen für Anoctamin-4-Wildtyp, das 4077 Basenpaare lang ist. Insgesamt besteht das vollständige Anoctamin-4-Plasmid somit aus 10180 Basenpaaren (10,18kb). Das Plasmid enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen.

Plasmid für Bestrophin-1:

Das Plasmid „peGFPN-1“ ist 4733 Basenpaare lang und enthält das 1755 Basenpaare lange Bestrophin-1-Gen. Somit ist das gesamte Bestrophin-1-Plasmid 6488 Basenpaare lang (6,488kb). peGFPN-1 enthält ein Kanamycin-Resistenz-Gen und ein GFP-Gen (grün fluoreszierendes Protein).

7.1.3. Protokoll für die zielgerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis)

Zum Erzeugen der gewünschten spezifischen Mutationen in den Plasmiden wurde das QuickChange site-directed mutagenesis Kit (Agilent Technologies) verwendet. Das zugehörige Protokoll von Agilent Technologies wurde befolgt und an einigen Stellen leicht verändert. In Tabelle 7 sind die Änderungen detailliert angegeben.

Die Oligonukleotidprimer zum Erzeugen der gewünschten Mutationen wurden mithilfe des QuickChange Onlineprogramms

(https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp?toggle=uploadNow&mutate=true&_requestid=741972) entworfen und anschließend bestellt. Im Kapitel 7.1.4. sind die verwendeten Primer für die jeweiligen Mutationen aufgelistet.

Als Ausgangs-DNA für die zielgerichtete Mutagenese dienten das Plasmid „pcDNA3.1 (+) c-Myc-tec“, das das Gen für Anoctamin-4-Wildtyp enthielt, sowie das Plasmid „peGFPN-1“, in das das Gen für Bestrophin-1-Wildtyp integriert war. In Abbildung 1 ist der Ablauf der zielgerichteten Mutagenese schematisch dargestellt.

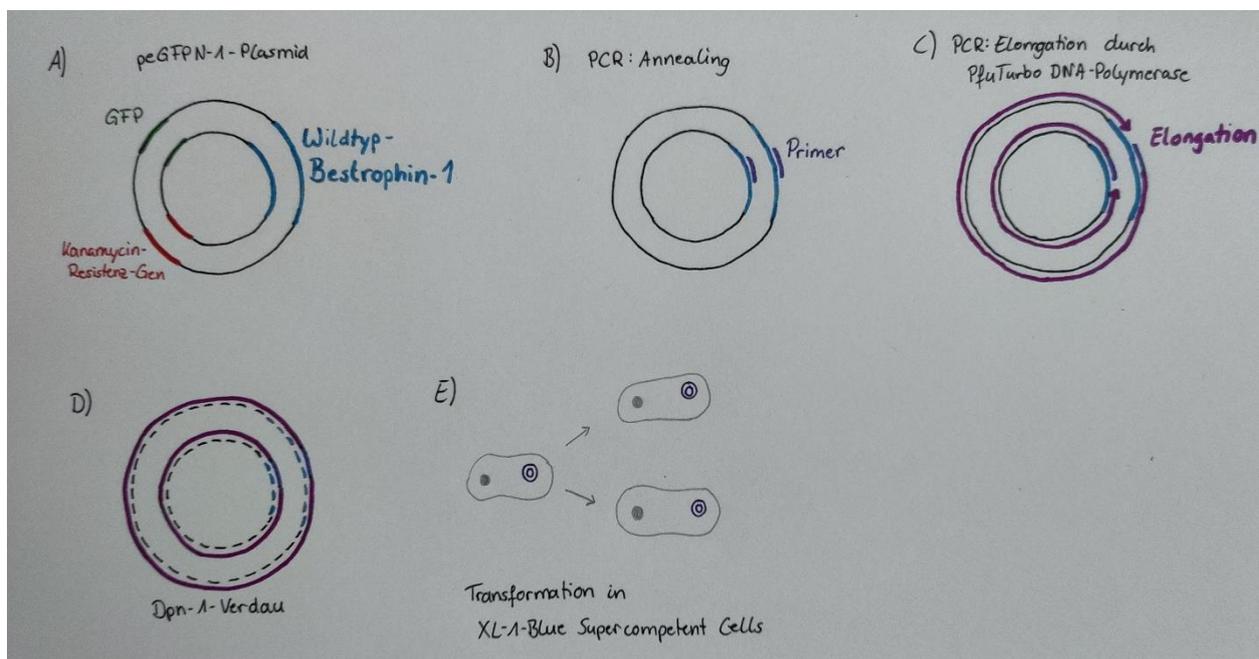


Abbildung 1: Schematische Skizzierung zum Ablauf der zielgerichteten Mutagenese (eigenständige Skizze in Anlehnung an das Herstellerprotokoll des QuickChange site-directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies). A) Das peGFPN-1-Plasmid enthält Bestrophin-1-Wildtyp, ein Kanamycin-Resistenz-Gen und ein GFP-Gen (grün fluoreszierendes Protein). B) Während der Polymerasekettenreaktion (PCR) binden die Primer spezifisch an die Gen-Region, in der die Mutation gewünscht wird. C) Während der Elongationsphase der PCR verlängert die PfuTurbo DNA-Polymerase die Primer. Dieser Vorgang wird für mehrere PCR-Zyklen wiederholt. D) Während des Dpn1-Verdau verdaut die Endonuklease Dpn-1 das methylierte Ausgangs-Plasmid (inklusive der Wildtyp-DNA), sodass nur die nicht-methylierte neu generierte mutationstragende DNA übrig bleibt. E) Transformation des mutationstragenden Plasmids in XL1-Blue Supercompetent Cells zur Generierung größerer Mengen an DNA.

Im Herstellerprotokoll für die zielgerichtete Mutagenese wird empfohlen, 5-50ng DNA des Wildtyp-Plasmids für die Polymerasekettenreaktion (PCR) zu verwenden. Um die Menge an PCR-Produkt und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transformation zu erhöhen, wurde die empfohlene Höchstmenge an DNA verwendet, 50ng für die Bestrophin-1-Mutationen und 45ng für die Anoctamin-4-Mutationen. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes erfolgte auf Eis, im zügigen Tempo und in folgender Reihenfolge: RNase freies Wasser, 10x Reaktionspuffer, Wildtyp-DNA, beide Oligonukleotidprimer, dNTP-Mix. Anschließend wurde die PfuTurbo DNA-

Polymerase hinein pipettiert (beziehungsweise PfuUltraHF DNA-Polymerase bei Anoctamin-t2147c und Bestrophin-R218C).

Nachfolgend wurde die PCR direkt gestartet, wofür der iCycler Optical Module von BIO-RAD verwendet wurde. Während der PCR wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, die Primer lagern sich an die spezifische DNA-Stelle an (Abbildung 1B) und die DNA-Polymerase verlängert die Primer (Abbildung 1C). Dadurch erzeugt die DNA-Polymerase jeweils einen neuen komplementären DNA-Strang, der den Oligonukleotidprimer und damit die gewünschte Mutation enthält.

Die im Herstellerprotokoll vorgeschlagene Annealing-Temperatur und die Anzahl der PCR-Zyklen wurden teilweise deutlich erhöht (siehe Tabelle 7). Die empfohlene Annealing-Temperatur (55°C) wurde auf bis zu 66°C erhöht. Für Punktmutationen empfiehlt der Hersteller 12 PCR-Zyklen und für Deletions- und Insertionsmutationen 18 PCR-Zyklen. Die Zyklen wurden auf bis zu 16 Zyklen (Punktmutationen) bzw. 24 Zyklen (Deletions- und Insertionsmutationen) erhöht. Die Länge der Elongationsphase wurde entsprechend des Protokolls gewählt – eine Minute pro kb Plasmidlänge. So wurden für die Anoctamin-Mutationen 10 Minuten eingestellt (5493 Basenpaare Plasmid + 4077 Basenpaare Anoctamin-4-Wildtyp = 10180 Basenpaare = 10,18kb) und für die Bestrophin-Mutationen 7 Minuten (4733 Basenpaare Plasmid und 1755 Basenpaare Bestrophin-1-Wildtyp = 6488 Basenpaare = 6,488kb).

Nach der PCR wurden die PCR-Gefäße gekühlt gehalten (4°C) im PCR-Gerät oder im Kühlschrank (für maximal 24 Stunden). Anschließend wurde das PCR-Produkt dem Dpn-1-Verdau unterzogen (genau nach Herstellerprotokoll), bei dem die Endonuklease Dpn-1 die Wildtyp-DNA verdaut. Sie schneidet nur methylierte und hemimethylierte DNA und selektioniert somit die in der PCR generierte, Mutation-enthaltene DNA, die nicht methyliert ist (Abbildung 1D).

Bis zu 10µl des Dpn-1-verdauten PCR-Produkts (1µl im Herstellerprotokoll) wurden in die superkompetenten Zellen (QuickChange XL1-Blue Supercompetent Cells von Agilent Technologies) transformiert (Abbildung 1E). Anstelle der NZY+ Broth-Lösung wurde SOC-Lösung verwendet (hergestellt nach dem Transformationsprotokoll für die QuickChange XL1-Blue Competent Cells von Agilent Technologies, siehe Kapitel 6.4.2). Die 14ml BD-Falcon Tubes wurden meist etwa 2 bis 3 Stunden inkubiert bei 225-250 rpm (Orbital Incubator S150 Stuart), jedoch auch bis zu 5 Stunden (im Herstellerprotokoll 1 Stunde empfohlen). Ausgesät wurden zweimal 250µl oder einmal 500µl pro Mutationsversuch auf LB-Agar-Platten, die entweder Ampicillin (für Anoctamin-4-Mutationen) oder Kanamycin (für Bestrophin-1-Mutationen) enthielten. In die Plasmide sind neben dem Anoctamin-4-Gen beziehungsweise dem Bestrophin-1-Gen jeweils ein Antibiotikum-Resistenzgen integriert (Ampicillin-Resistenzgen für Anoctamin-4

und Kanamycin-Resistenzgen für Bestrophin-1). Durch diese integrierten Antibiotikumresistenzgene können ausschließlich superkompetenten Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen haben. Superkompetente Zellen, die kein Plasmid aufgenommen haben können somit nicht auf den Agar-Platten wachsen.

Nach mindestens 16 Stunden Inkubation bei 37°C wurden Zellklone gepickt – sofern welche gewachsen waren – und in LB-Medium-Ampicillin bzw. LB-Medium-Kanamycin für weitere mindestens 16 Stunden bei 37°C und 225-250 rpm inkubiert. Die DNA wurde isoliert mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) und vollständig sequenziert durch Eurofins Genomics (Sequencing Department, Anzinger Str. 7a, 85560 Ebersberg), um zu überprüfen, ob die gewünschte Mutation entstanden war und um neuentstandene unbeabsichtigte Mutationen auszuschließen.

Nach Bestätigung einer erfolgreichen Mutation wurde das mutierte Plasmid in kompetente Zellen (QuickChange XL1-Blue Competent Cells, Agilent Technologies) transformiert, um eine größere DNA-Menge herzustellen. Anschließend erfolgte das Aussäen auf LB-Agarplatten, das Picken von Bakterienklonen in LB-Medium und die DNA-Isolation mit dem Qiagen Plasmid Plus Midi / Maxi Kit (Qiagen).

Mutation	Menge Plasmid	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklen	verwendete Menge zur Transformation	Inkubation	Menge ausgesät
Anoctamin-4						
c387g	45 ng	55°C	14	1 µl	120 min	250 µl
g1582a	45 ng	55°C	14	1 µl	120 min	250 µl
c1674g	45 ng	55°C	16	10 µl	180 min	250 µl
a1684t	55 ng	62°C	16	10 µl	200 min	250 µl
t1688a	45 ng	60°C	16	10 µl	180 min	250 µl
a1807g	45 ng	60°C	16	8 µl	130 min	250 µl
t2147c * ¹	45 ng	55°C	14	1 µl	150 min	500 µl
Bestrophin-1						
T6P	50 ng	55°C	16	5 µl	120 min	250 µl
F80L	50 ng	55°C	16	8 µl	180 min	500 µl
R218C * ¹	50 ng	55°C	14	1 µl	140 min	500 µl
F305S	50 ng	55°C	16	5 µl	120 min	250 µl
Del881-886	50 ng	66°C	24	10 µl	120 min	250 µl

295Ins	50 ng	63°C	24	10 µl	300 min	250 µl
---------------	-------	------	----	-------	---------	--------

Tabelle 7: Spezifische Abweichungen vom Hersteller-Protokoll bei den einzelnen Anoctamin-4- und Bestrophen-1-Mutationen

*1 für die Mutationen R218C und t2147c wurde die PfuUltraHF DNA-Polymerase verwendet statt der PfuTurbo DNA-Polymerase. Die PfuTurbo DNA-Polymerase ist die im Herstellerprotokoll empfohlene DNA-Polymerase.

7.1.4. Verwendete Primer für die Mutagenese

Mutationsbezeichnung	Primersequenz (von 5' nach 3')
c387g	F: CTTTTCAGTCTGAGGCTTGGATTTTCTGTACACAAGAATG R: CATTCTTGTGTACAGAAAATCCAAGCCTCAGACTGAAAAG
g1582a	F: GGATCGTCATTTACAGGATGGTGACTGTGAGCACT R: AGTGCTCACAGTCACCATCCTGTAAATGACGATCC
c1674g	F: GCAGCATAATGATACAAAACCTTGATGCATACTGCAGTCC R: GGACTGCAGTATGCATCAAGTTTTGTATCATTATGCTGC
a1684t	F: AGAGCACATTCAGCAGCATAAAGATACAAAAGTTGATGCATAC R: GTATGCATCAACTTTTTGTATCTTTATGCTGCTGAATGTGCTCT
t1688a	F: GCACATTCAGCAGCTTAATGATACAAAAGTTGATGCATACTG R: CAGTATGCATCAACTTTTTGTATCATTAAAGCTGCTGAATGTGC
a1807g	F: GTAAAAAGTGGAGCTGTTTCAGATCGACAAAACCTGAAAAAGAAACATTT R: AAATGTTTCTTTTTTCAGTTTGTGCGATCTGAACAGCTCCACTTTTTAC
t2147c	F: AATCCGAACTGAAGGATCGTTTCCAGGTATTCATCGAAG R: CTTGATGAATACCTGGAAACGATCCTTCAGTTCGGATT

Tabelle 8: verwendete Primer für die Mutagenese der gewünschten Punktmutationen im Anoctamin-4-Gen

Mutationsbezeichnung	Primersequenz (von 5' nach 3')
T6P	F: ATGACCATCACTTACCCAAGCCAAGTGGCT R: AGCCACTTGGCTTGGGTAAGTGATGGTCAT
F80L	F: ATCCCATTTCCTTAGTGCTGGGCTTCTAC R: GTAGAAGCCCAGCACTAAGGAAATGGGGAT
R218C	F: AGATGAACACCTTGTGTAICTCAGTGTGGAC R: GTCCACACTGAGTACACAAGGTGTTTCATCT
F305S	F: CCAGTTGGTCTCAGAATCATCATCATCCTCTCCAAAGGG R: CCCTTTGGAGAGGATGATGATGATTCTGAGACCAACTGG
295del	Schritt 1: (Entfernung von 2 Nukleotidtripletts) 881_886del F: GGTGGCAGAGCAGCACCCCTTTGGAGAG 881_886del R: CTCTCCAAAGGGGTGCTGCTCTGCCACC Schritt 2: (Einfügen eines Nukleotidtripletts)

	881_883ins F: GGTGGCAGAGCAGCTCAACCCCTTTGGAGAG
	881_883ins R: CTCTCCAAAGGGGTTGAGCTGCTCTGCCACC

Tabelle 9: verwendete Primer für die Mutagenese der gewünschten Mutationen im Bestrophin-1-Gen

7.2. Methodik: Immunzytochemie an HEK293-Zellen zur Untersuchung von Anoctamin-4

7.2.1. Zellkulturbedingungen für HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney-Zellen) entstammten der American Type Cell Culture Collection ((ATCC), CRL-1573; ATCC, Wesel, Deutschland). Sie wuchsen in einem Medium bestehend aus DMEM+Glutamax, 10% Fötale Rinderserum (FBS) und 1% Penicillin-Streptomycin (P/S) bei 37°C, relativer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂. Die Zellen wurden alle ein bis drei Tage auf ihr Wachstum und mögliche Kontaminationen makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert. Nach drei bis fünf Tagen, wenn die Zellen innerhalb der Zellkulturflasche zu etwa 80-100% konfluent gewachsen waren, wurde mit Hilfe von Trypsin/EDTA passagiert. Für die Experimente wurden die HEK-Zellen (aus jeweils niedrigen Passagenummern) auf 12mm Glas-Coverslips in einer 24er Well-Platte ausgesät. Um eine gute Haftung der Zellen auf den Coverslips zu gewährleisten, wurden diese vor dem Aussäen mit einer Schicht aus Poly-L-Lysin gecoatet (überzogen). Dies erfolgt mit 0,01% Poly-L-Lysin (Sample 1-2 *²) beziehungsweise mit einer Konzentration von 0,005% Poly-L-Lysin (ab Sample 3 *²). Eine geringere Konzentration an Pol-L-Lysin (0,0001%) war nicht ausreichend für ein sicheres Anheften der Zellen. Zum Coaten wurden die Coverslips mit Poly-L-Lysin für mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

*² Anmerkung: Mit „Sample“ wird die Immunzytochemie eines Datums bezeichnet. Färbungen mit denselben Antikörperkombinationen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden erhalten jeweils eine andere Sample-Nummer (aufsteigend) und können somit voneinander unterschieden werden.

7.2.2. Transfektion und Mediumwechsel

Die Transfektion der HEK-Zellen mit den Anoctamin-4-Plasmiden erfolgte nach etwa ein bis zwei Tagen Wachstum auf den Coverslips und bei einer Konfluenz von etwa 50% mittels Lipofectamin 2000 nach etwas angepasstem Herstellerprotokoll:

Transfektionsprotokoll:

- Das Mengenverhältnis von Lipofectamin 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) zur DNA betrug 2:1

- Pro Well wurden 300µl serumfreies Medium (Opti-MEM, gibco) berechnet
 - in 150µl Opti-MEM wurde die DNA pipettiert
 - in 150µl Opti-MEM wurde Lipofectamin pipettiert (Lipofectamin/DNA Verhältnis 2:1)
- 5 Minuten Inkubation der Lipofectamin-Opti-MEM-Lösung und der DNA-Opti-MEM-Lösung
- Vorsichtiges Pipettieren der DNA-Opti-MEM-Lösung auf die Lipofectamin-Opti-MEM-Lösung
- 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- Abpipettieren des serumhaltigen Mediums aus den Wells und hinauf pipettieren des Transfektionsreagenzes auf die Coverslips

Für die Immunzytochemie mit dem Anti-Pan-Cadherin-Antikörper erfolgte anfänglich (Samples 1 – 4) die Transfektion mit 200ng DNA (entspricht einer Konzentration von 0,66ng DNA/µl serumfreies Medium). Zur Untersuchung des Effekts unterschiedlicher DNA-Mengen in der Transfektion auf die Zellmembranexpression von Wildtyp-Anoctamin-4 wurden jeweils verschiedene DNA-Mengen transfiziert, nämlich 200ng (entspricht 0,66ng DNA/µl), 100ng (entspricht 0,33ng DNA/µl) oder 50ng (entspricht 0,166ng DNA/µl) pro Coverslip.

Für die Immunzytochemie zur Assoziation von Anoctamin-4 zu den frühen Endosomen und den Lysosomen wurden jeweils 100ng DNA (entspricht 0,33ng DNA/µl) verwendet.

Mediumwechsel:

Acht Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt – das Opti-MEM wurde abpipettiert und das HEK-Zell-Medium hinauf pipettiert. 24 Stunden nach der Transfektion (16 Stunden nach dem Mediumwechsel) erfolgte die Fixierung der Zellen. Bei den Färbungen mit verkürztem Intervall von 12 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung erfolgte kein Mediumwechsel.

7.2.3. Immunzytochemie-Färbung

Mit „Sample“ wird die Immunzytochemie eines Datums bezeichnet. Färbungen mit denselben Antikörperkombinationen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden erhalten jeweils eine andere Sample-Nummer (in aufsteigender Reihenfolge) und können somit voneinander unterschieden werden.

Protokoll für die Immunzytochemie:

- 1x Waschen mit TBS-Puffer (Tris-buffered saline)
- 4% PFA/Paraformaldehyd für 10 Minuten zur Fixierung der Zellen
- 3x Waschen mit TBS-Puffer
- 0,5% Triton X-100 für 10 Minuten zum Permeabilisieren der Zellen

- 3x Waschen mit TBS-Puffer
- 5% Bovines Serumalbumin (BSA) für 45 Minuten bei Raumtemperatur zum Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen
- Inkubation mit primären Antikörpern (siehe Tabelle 10): TBS-Puffer vorlegen (200µl pro Well), die primären Antikörper in entsprechender Konzentration in den TBS-Puffer hinein pipettieren, vermischen durch hoch und runter pipettieren. Abpipettieren des BSA und direktes Auftragen der Antikörper (ohne erneutes Waschen). Inkubation der Coverslips mit den primären Antikörpern im Kühlschrank bei 4°C für 24 - 48 Stunden.
- 3x Waschen mit TBS-Puffer
- Inkubation mit sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 11) inklusive des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI: Vorlegen der 300 nm DAPI-Arbeitslösung, sekundäre Antikörper in entsprechender Konzentration in die 300 nM DAPI-Arbeitslösung hinein pipettieren, vermischen. Abpipettieren des TBS-Puffers und hinauf pipettieren der sekundären Antikörper. Inkubation der Coverslips mit den sekundären Antikörpern für 45 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt.
- 3x Waschen mit TBS-Puffer
- Aufbringen der Coverslips auf Objektträger: Auftropfen eines Tropfens von Fluoreszenz optimiertem Mounting Medium, Fassen des Coverslips mit einer Pinzette und Auflegen des Coverslips mit den Zellen in Richtung des Objektträgers unter Vermeidung der Bildung von Luftbläschen.
- Lagerung der Objektträger lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C bis zum Mikroskopieren

7.2.4. Primäre Antikörper für Immunzytochemie an HEK293-Zellen (Tabelle 10)

Struktur/Antigen	Spezies	Verdünnung	Firma (Katalognummer)
Anti-Anoctamin-4	Rabbit	1:100	Abcam (ab170008)
Anti-Pan-Cadherin	Mouse	1:200	Abcam (ab6528)
Anti-early endosome antigen 1 (EEA1)	Sheep	1:100	R&D (AF8047)
Anti-lysosome-associated membrane protein 1 (Lamp1)	Mouse	1:100	Cell Signalling (D401S)
Anti-cleaved Caspase 3	Rabbit	1:1000	Cell Signalling (Asp175)

7.2.5. Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie an HEK293-Zellen (Tabelle 11)

Name	Struktur/ Antigen	Eigene Spezies	Absorptions- / Emissions- maxima	Verdün- nung	Firma (Katalognummer)	Farbe auf Fotos
AF546	Anti-rabbit (Anoctamin-4, cleaved Caspase-3)	donkey	556nm / 573nm	1:1000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (A10040)	Rot
AF647	Anti-mouse (Pan- Cadherin, Lamp1)	donkey	650nm / 665nm	1:1000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (A-31571)	Grün (Pan- Cadherin), Türkis (Lamp1)
AF488	Anti-sheep (EEA1)	donkey	495nm / 519nm	1:1000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (A-11015)	Gelb
DAPI	DNA		358nm / 461nm	Verwendung von 300 nM	Sigma-Aldrich (D9542)	Blau

7.2.6. Versuche vor/ während der Immunzytochemie

7.2.6.1. Experimente mit Natriumphanylbutyrat als Chaperon mit der Frage nach einer Veränderung des Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Pan-Cadherin und Anoctamin-4

Für die Experimente mit Natriumphanylbutyrat erfolgte acht Stunden nach der Transfektion die Inkubation mit 2,5mM Natriumphanylbutyrat (Sodium 4-Phenylbutyrate, Na⁺-4-PBA oder 4PBA) in serumhaltigem Kulturmedium (DMEM+Glutamax plus Zusätze, siehe Kapitel 6.5.1.). Die Zellen wurden für 16 Stunden inkubiert mit 4PBA, anschließend wurden sie fixiert mit Paraformaldehyd. Für die Kontrollgruppe erfolgte acht Stunden nach der Transfektion ein Mediumwechsel und die Applikation des serumhaltige Kulturmediums ohne Zusatz von 4PBA.

7.2.6.2. Untersuchungen zur Apoptoserate Anoctamin-4-transfizierter HEK-Zellen mit dem anti-cleaved Caspase-3-Antikörper

Das oben beschriebene Färbeprotokoll wurde in folgenden Protokollschritten verändert:

- 1% Triton X-100 statt 0,5% und Inkubation für 20 Minuten statt 10 Minuten, mit dem Ziel, die Zellen sicherer zu permeabilisieren und für den primären Antikörper zugänglich zu machen
- kein Blockieren mit 5% BSA, sondern direktes Auftragen der primären Antikörper, da BSA unspezifische Bindungsstellen für Caspase-3 erzeugt
- Antikörper:
 - Primärer Antikörper: rabbit anti-cleaved Caspase-3-Antikörper (Cell Signalling), 1:1000 verdünnt
 - Sekundärer Antikörper: AF546 donkey anti-rabbit (Invitrogen by Thermo Disher Scientific), 1:1000 verdünnt
- Substanzen zum Erzeugen einer Positivkontrolle (durch Erzeugung von Zellstress):
 - Cobalt-II-Chlorid
 - Konzentrationen: 300µM oder 600µM
 - verschiedene Inkubationszeiten (1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 36h)
 - Wasserstoffperoxid
 - Konzentrationen: 1mmol/l, 100µmol/l, 10µmol/l, 1µmol/l, 0,1µmol/l
 - Inkubationszeit: 3 Stunden

7.2.7. Negativkontrollen

Kontrolle des Primären Antikörpers:

Um die Spezifität des primären rabbit Anti-Anoctamin-4-Antikörpers zu überprüfen, wurden HEK-Zellen ohne transfiziertem Anoctamin-4 verwendet. Die HEK-Zellen wurden nicht transfiziert, aber das restliche Protokoll blieb unverändert – die Fixierung und die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern erfolgte simultan zu den transfizierten HEK-Zellen.

Kontrolle des Sekundären Antikörpers:

Um die Spezifität des sekundären Antikörpers gegen den primären Anti-Anoctamin-4-Antikörper zu überprüfen, wurden mit Anoctamin-4-Wildtyp transfizierte HEK-Zellen ohne primäre Antikörper inkubiert (sondern ausschließlich mit TBS). Das restliche Protokoll blieb unverändert, genauso wie die Inkubation mit dem sekundären Antikörper AF546 anti-rabbit, der eigentlich an den primären Antikörper rabbit Anti-Anoctamin-4 bindet.

7.2.8. Mikroskopieren der Immunzytochemie an mit Anoctamin-4-transfizierten HEK293-Zellen

Das Mikroskopieren des Samples 1 erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop von Zeiss (LSM 510 Confocal Microscope) und ab Sample 2 wurde am konfokalen Fluoreszenzmikroskop von Leica (Confocal Microscope SPE Leica) mikroskopiert. Zum Mikroskopieren der

Immunzytochemie unter Verwendung des anti-cleaved Caspase 3-Antikörpers diente das Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager.M2.

Am konfokalen Fluoreszenzmikroskop von Leica wurden folgende Einstellungen und folgendes Vorgehen berücksichtigt: Es wurde das 63er Objektiv und Immersionsöl verwendet. Das Format wurde auf 1024x1024 Pixel eingestellt. Zusätzlich wurde der optische Zoom verwendet, sodass die einzelnen Zellen beim Fotografieren möglichst groß und mittig sind. Der Zoom wurde auf maximal 4,5 eingestellt. Der digitale Zoom am Computer wurde nicht verwendet.

Es wurde versucht, möglichst einzelne Zellen am Rande des konfluenten Monolayers aufzusuchen und zu fotografieren, da dicht nebeneinander liegende Zellen oder sich überlappende Zellen nicht geeignet sind zur Untersuchung der Kolo-kalisation (da sie schwer mit dem Freihandwerkzeug umfahren werden können bei der späteren Auswertung mit der ImageJ-Software). Die Zellen wurden überprüft auf gesundes Aussehen (mit den HEK-Zell-typischen Ausziehungen, Zellkerne einfach und rund bis oval sowie nicht zerstückelt, keine kreisrunden Zellen). Anschließend wurde die Z-Ebene so eingestellt, dass die Zelle möglichst mittig „geschnitten“ ist, also dass das Pan-Cadherin-Signal möglichst geschlossen die Zelle einkreist und innerhalb der Zelle möglichst wenig Pan-Cadherin-Signal zu sehen ist. Teilweise waren die Zellen in dieser Schnittebene dann doch eher rund geformt, die HEK-Zell-typischen Ausziehungen waren dann eher in den Schnittebenen über- und unterhalb zu finden. Bei den Färbungen ohne Anti-Pan-Cadherin-Antikörper diente der Farbkanal von Anoctamin-4 als Orientierung zum Aussuchen der geeigneten Z-Ebene. Hier wurde die Z-Ebene so gewählt, dass der Zelldurchmesser und der Zellkerndurchmesser jeweils möglichst groß waren.

In der Regel waren auf den Coverslips sehr viele HEK293-Zellen zu finden, schätzungsweise bis zu tausend Zellen. Die Transfektionseffizienz von Anoctamin-4 in HEK293-Zellen war bei allen Färbungen sehr hoch. Sie wurde nur qualitativ während des Mikroskopierens abgeschätzt und wurde nicht quantitativ ermittelt. Sie wird auf etwa 80% geschätzt. Das bedeutet, dass für jede Färbung sehr viele Zellen zur Verfügung standen, die jedoch nicht alle einzeln betrachtet werden konnten. Für jeden Coverslip eines Samples wurde etwa 15 - 20 HEK-Zellen ausgewählt und am Mikroskop fotografiert. Es wurde auf die oben genannten Kriterien geachtet und es wurde darauf geachtet, dass die Zellen aus verschiedenen Bereichen des Coverslips kamen (aus mindestens drei verschiedenen Bereichen), um eine möglichst repräsentative Auswahl zu ermöglichen.

Am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden die Sequenzeinstellungen (Laserintensität, Gain-Stärke, Smart Offset) einmal erstellt und dann versucht, für alle Samples möglichst so beizubehalten. Dieser Schritt war recht kritisch, da die später errechneten Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) auch abhängig von der Signalintensität sind. Deshalb wurde

darauf geachtet, dass die maximalen Signalintensitäten der verschiedenen Antikörper möglichst ähnlich zueinander sind, also dass die maximale Signalintensität für Anoctamin-4 etwa der Signalintensität des Pan-Cadherins entspricht bzw. der Signalintensität von EEA1 bzw. von Lamp1. Beim Erstellen der Sequenzen wurde auf folgendes geachtet: Die Laserintensität wurde versucht möglichst gering einzustellen (Werte meist zwischen 10 und 25) und der Verstärker (Gain) wurde versucht möglichst unter 1000mV einzustellen (Werte meist zwischen 900 und 1000mV). Die Laser- und Gain-Stärke wurden so angepasst, dass gerade so keine übersättigten Bereiche mehr im Bild zu sehen waren. Das Hintergrundrauschen wurde mit „Smart Offset“ zwischen -5% und 0% eingestellt, eher in Richtung -5%, um möglichst wenig unspezifisches Hintergrundrauschen zu haben. Es wurde angestrebt, diese eingestellten Sequenzen beizubehalten, um die Bilder untereinander möglichst gut vergleichen zu können. In folgenden Situationen musste die Signalintensität jedoch angepasst werden: Die Signalintensitäten unterschieden sich leicht zwischen den verschiedenen Versuchsreihen, sodass beim Beginn des Mikroskopierens eines neuen Samples ggf. leichte Änderungen vorgenommen wurden. Die Signalintensitäten variierten zwischen den Coverslips eines einzelnen Samples, sodass hier ggf. ebenfalls die Signalintensitäten optimiert werden mussten, sodass die Signalintensitäten der verschiedenen Sekundärantikörper auf einem Coverslip sich ähnlich intensiv zueinander darstellten. Weiterhin gab es Färbungen, bei denen auf demselben Objektträger Bereiche mit Zellen mit stärkeren Antikörper-Signalen und Bereiche mit schwächeren Antikörper-Signalen vorzufinden waren. Dieser Varianz wurde dadurch begegnet, dass pro Coverslip zufällig verschiedene Bereiche herausgesucht wurden und nicht alle fotografierten Zellen eines Coverslips aus derselben Region eines Coverslips entsprangen. Mit diesem Vorgehen wurde versucht, der Abwägung und Gradwanderung gerecht zu werden, sowohl „dieselben Einstellungen für alle mikroskopierten Zellen“ zu haben als auch „gleiche Farbintensitäten aller Antikörper-Kanäle aller Zellen“.

7.3. Methodik: Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen zur Untersuchung von Bestrophin-1

7.3.1. Auftauen und Aussäen der iPS-RPE-Zellen

Die iPS-RPE-Zellen (iPSC - induced pluripotent stem cell, RPE – retinales Pigmentepithel) wurden aus humanen Hautfibroblasten gewonnen. Die wildtypischen Kontrollzellen beruhen auf dem Dresdner iPS-Wildtyp O27-08 (CRTDi004-A) (Zhu et al., 2013). Die iPS-Zelllinie eines Patienten mit definierter Bestrophin-1-Mutation wurde durch Stephan Tsang (New York, Columbia University) geliefert. Die iPS-Zellen wurden durch die Gruppe von Prof. Dr. Marius Ader am Zentrum für Regenerative Therapien Dresden (CRTD) in RPE-Zellen differenziert. Dort

erfolgte die vollständige Differenzierung der iPSC-RPE und auch die Qualitätskontrollen wie beispielsweise die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (Zhu et al., 2013).

Zum einen wurden iPSC-RPE-Zellen eines gesunden Spenders verwendet, der nicht an Morbus Best litt. Diese iPSC-RPE sind somit Bestrophin-1 wildtypisch. Sie wurden mit einem Bestrophin-1-Plasmid (Wildtyp oder mutationstragend) transfiziert. Von den fünf hergestellten Mutationen wurde nur die Mutation T6P (sowie Wildtyp) zur Transfektion und zur Immunzytochemie dieser Monographie verwendet.

Zum anderen wurden iPSC-RPE-Zellen verwendet, die einem Patienten mit Morbus Best entstammten (Bestrophin-1 D302A, mutationsbedingter Austausch von Asparaginsäure durch Alanin) und deshalb schon mutationstragend waren und nicht zusätzlich mit exogenem Bestrophin-1 transfiziert wurden.

Die iPSC-Zellen wurden in Dresden hergestellt und nach dem Versand in Flüssigstickstoff gelagert.

Vorbereitung der Filter zum Aussäen der iPSC-RPE:

Die verwendeten Filter (Transwell Permeable Supports, 6,5mm Insert, 0,4µm Polyester Membrane Porengröße) ermöglichen die polarisierte Ausrichtung der RPE-Zellen, genauso wie das Coaten mit Matrigel. Das Matrigel wurde auf Eis aufgetaut und in RPE-Medium 1:20 verdünnt. Die Verwendung von gekühlten Pipettenspitzen vereinfachte das Pipettieren des dickflüssigen Matrigels (Lagerung der Pipettenspitzen zuvor für eine Stunden im Kühlschrank). Die Filter wurden für eine Stunde mit jeweils 100µl Matrigel-RPE-Medium bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Matrigel wieder abpipettiert und die frisch aufgetauten Zellen wurden ausgesät.

Auftauen und Aussäen der iPSC-RPE:

Nach dem Auftauen der iPSC-RPE-Zellen aus dem Stickstoff wurden sie direkt auf die Filter ausgesät, ohne sie zuvor in Zellkulturflaschen wachsen zu lassen und zu passagieren, da iPSC-RPE nur begrenzt passagierfähig sind (Singh et al., 2013a; Grisanti und Guidry, 1995; Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011; Buchholz et al., 2009).

- 15ml RPE-Medium in ein Gefäß (tube) vorlegen und Medium im Wasserbad erwärmen
- iPSC-RPE-Zellen aus dem Flüssigstickstoff nehmen, auftauen lassen und in das aufgewärmte RPE-Medium pipettieren
- Zentrifugieren bei 500 rpm für 3 Minuten
- Abpipettieren des Überstands
- Resuspendieren des Zellpellets in neuem RPE-Medium (Kalkulation mit 200µl aufgewärmten Medium pro Filter)

- 200µl resuspendierte Zelllösung auf die Filter hinauf pipettieren
- 200µl RPE-Medium in das Well pipettieren (unterhalb des Filters), um ein Austrocknen der Zellen auf den Filtern zu vermeiden
- Inkubation der Zellen bei 37°C, relativer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂

7.3.2. Transfektion

Transfiziert wurden die iPS-RPE-Zellen, sobald sie sich zu einem Monolayer verdichtet hatten, was in der Regel nach 2 bis 3 Tagen der Fall war (2 Tage bei Sample A, 3 Tage in Sample B). Zwischendurch wurde einmal das RPE-Medium durch frisches Medium ausgetauscht. Das Wachstum und die Bildung eines Monolayers wurden unter einem einfachen Lichtmikroskop beurteilt.

Transfektionsprotokoll für die Transfektion der gesunden iPS-RPE-Zellen mit Wildtyp/T6P:

- Das Mengenverhältnis von Lipofectamin 2000 Transfection Reagent zu DNA betrug 2:1
- Pro Filter wurden 200µl serumfreies Medium (Opti-MEM) berechnet
 - in 100µl davon wurde die DNA pipettiert (500ng DNA für 200µl serumfreies Medium, entsprechen einer Konzentration von 2,5ng/µl)
 - in die andere Hälfte wurde Lipofectamin pipettiert (Lipofectamin/DNA-Verhältnis 2:1)
- 5 Minuten Inkubation der Lipofectamin-Opti-MEM-Lösung und der DNA-Opti-MEM-Lösung
- Vorsichtiges Pipettieren der DNA-Opti-MEM-Lösung auf die Lipofectamin-Opti-MEM-Lösung
- 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- Abpipettieren des serumhaltigen Mediums und hinauf pipettieren des Transfektionsreagenzes auf die Filter

Die Patientenzellen wurden nicht mit exogenem Bestrophin-1 transfiziert.

7.3.3. Experimente mit Natriumphénylbutyrat als Chaperon mit der Frage nach einer Veränderung der Pearson's Korrelationskoeffizienten

Die Experimente mit Natriumphénylbutyrat (4PBA) erfolgten analog dem Protokoll der 4PBA-Experimente für Anoctamin-4 (Kapitel 7.2.6.1.), mit der Ausnahme, dass jeweils verschiedene Kulturmedien verwendet wurden. Acht Stunden nach der Transfektion erfolgte die Applikation von 2,5mM 4PBA in iPSC-RPE-Kulturmedium (Zusammensetzung wird in Kapitel 6.5.1. beschrieben). Die iPS-RPE-Zellen wurden für 16 Stunden inkubiert mit 4PBA, anschließend wurden sie fixiert mit Paraformaldehyd. Für die Kontrollgruppe erfolgte 8 Stunden nach der Transfektion ein Mediumwechsel und die Applikation des iPS-RPE-Kulturmediums ohne Zusatz von 4PBA.

7.3.4. Immunzytochemie-Färbung

Die beiden Färbungen an iPS-RPE-Zellen werden als Sample A und Sample B bezeichnet.

Das Fixieren der iPS-RPE-Zellen erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion und somit 16 Stunden nach der 4PBA-Inkubation bzw. 16 Stunden nach dem Mediumwechsel. Das Protokoll ähnelte sehr dem Vorgehen bei den HEK293-Zellen für Anoctamin-4. Für die bessere Verständlichkeit wird es hier aber trotzdem vollständig aufgeführt.

Protokoll für die Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen:

- 1x Waschen mit TBS-Puffer (Tris-buffered saline)
- 4% PFA (Paraformaldehyd) für 10 Minuten zum Fixieren der Zellen
- 2x Waschen mit TBS-Puffer
- 0,5% Triton X-100 für 10 Minuten zum Permeabilisieren der Zellen
- 2x Waschen mit TBS-Puffer
- 5% Bovines Serumalbumin (BSA) für 60 Minuten bei Raumtemperatur zum Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen. Anschließend abpipettieren des BSA
- Herauspräparieren des Filterpapiers aus dem Filter mit einem Skalpell und einer anatomischen Pinzette. Aufbringen des Filters auf einen Objektträger. Halbieren des Filterpapiers mit einem Skalpell, um mehr verschiedene Färbungen zu machen zu können.
- Zeichnen eines hydrophoben Kreises mit dem DAKO Pen um halbierten Filter, damit der TBS-Puffer innerhalb des gezeichneten Kreises verbleibt und damit das Filterpapier vollständig bedeckt wird vom TBS-Puffer
- Auftragen der primären Antikörper (siehe Tabelle 12): TBS-Puffer vorlegen (Kalkulation mit 45µl Antikörper-TBS-Lösung pro Filter), die primären Antikörper in entsprechender Konzentration in den TBS-Puffer hinein pipettieren, vermischen. Auftragen der Antikörper und Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer (humidity chamber) im Kühlschrank bei 4°C für 24-48 Stunden.
- 3x Waschen mit TBS-Puffer
- Inkubation mit sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 13) inklusive des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI: Vorlegen der 300 nm DAPI-Arbeitslösung, sekundäre Antikörper in entsprechender Konzentration in die 300 nM DAPI-Arbeitslösung hinein pipettieren, vermischen. Auftragen der sekundären Antikörper auf die Filter und Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur, lichtgeschützt in einer Feuchtigkeitskammer
- 3x Waschen mit TBS-Puffer
- Fertigstellen der Filter zum Mikroskopieren: Verlagern der Filter auf einen frischen Objektträger. Umzeichnen der Filter mit dem hydrophoben DAKO Pen. Auftropfen eines

Tropfens Fluoreszenz optimiertes Mounting Mediums. Abdecken mit einem 15mm Gals-Coverslip als Deckglas. Lagerung bei 4°C und lichtgeschützt bis zum Mikroskopieren.

7.3.5. Primäre Antikörper für Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen (Tabelle 12)

Struktur/Antigen	Spezies	Verdünnung	Gekoppelt?	Firma (Katalognummer)
Anti-Bestrophin-1	Mouse	1:200	Nein	Abcam (ab2182)
Anti-Cav1.3	Mouse	1:100	Nein	Alomone (CACNA1D)
Anti-early-endosome-antigen-1 (EEA1)	Rabbit	1:300	Nein	Abcam (ab2900)
Anti-lysosome-associated membrane protein 1 (Lamp1)	Rabbit	1:300	Nein	Abcam (24170)
Anti- β-Catenin	Rabbit	1:100	Nein	Cell Signalling Technology (8480S)
Anti-GFP	Goat	1:200	FITC-gekoppelt	Abcam (ab6662)

7.3.6. Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen (Tabelle 13)

Name	Struktur/ Antigen	Eigene Spezies	Absorptions-/ Emissions- maxima	Verdünnung	Firma (Katalognummer)
AF546	Anti-mouse (Bestrophin-1, Cav1.3)	donkey	556nm / 573nm	1:1000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (A10036)
AF647	Anti-rabbit (EEA1, Lamp1, β -Catenin)	donkey	650nm / 665nm	1:500	Dianova (711-605-152)
DAPI	DNA		358nm / 461nm	Verwendung von 300 nM	Sigma-Aldrich (D9542)

7.3.7. Mikroskopieren der Färbungen von iPSC-RPE-Zellen

Das Mikroskopieren der iPSC-RPE erfolgte analog dem Mikroskopieren der HEK-Zellen. Folgende Punkte unterschieden sich: Bei den mit Wildtyp oder mit T6P transfizierten iPSC-RPE wurden nur die Zellen mikroskopiert, die erfolgreich transfiziert waren. Durch eine GFP-Sequenz auf dem Bestrophin-1-Plasmid und durch die Verwendung eines entsprechenden Antikörpers (Abcam) konnten durch das Okular die transfizierten (GFP-positiven Zellen) von den nicht-transfizierten Zellen (nicht GFP-positiv) unterschieden werden. Da die iPSC als RPE-Zellen Bestrophin-1 exprimieren, ist die Unterscheidung zwischen endogenem Bestrophin-1 und transfizierten Bestrophin-1 wichtig.

Das Mikroskopieren des Samples A erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop von Zeiss (LSM 510 Confocal Microscope) durch Piotr Bucichowski. Das Sample B wurde eigenständig mikroskopiert und erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop von Leica (Confocal Microscope SPE Leica).

7.3.8. Negativkontrollen

Für die Negativkontrollen der Färbungen der iPSC-RPE wurden Patientenzellen verwendet. Diese wurden ohne primäre Antikörper inkubiert. Das restliche Protokoll, inklusive aller sekundären Antikörper blieb unverändert. Damit wurde die Spezifität der sekundären Antikörper kontrolliert.

7.4. Methodik: Auswertung der Immunzytochemie-Färbungen (HEK293-Zellen und iPSC-RPE-Zellen)

7.4.1. Auswertung mit ImageJ - Errechnen der Pearson's Korrelationskoeffizienten und Ermittlung von Pixelquotienten

Die immunzytochemischen Fotos der Anoctamin-4-Färbungen und der Bestrophin-1-Färbungen wurden mit dem Programm ImageJ quantitativ ausgewertet. Zuvor wurden die Fotos mit der Software ZEISS ZEN lite (für die Fotos vom Zeiss-Mikroskop) bzw. LASX (für die Fotos vom Leica-Mikroskop) in das JPEG-Format überführt. Die farbigen Bilder wurden im ImageJ-Programm über „Image -> Color -> Split channels“ in ihre Farbkanäle aufgeteilt (in schwarz-grau-weiß). Dazu wurden die Fotos der einzelnen Antikörper-Farbkanäle jeweils verwendet und nicht das gemergte Bild (was alle Emissionskanäle beinhaltet). Die Zellen wurden auf den Fotos mit einem Freihandwerkzeug möglichst knapp ausgeschnitten und der Bereich außerhalb der umfahrenen Zelle mit „edit -> clear outside“ entfernt. Mithilfe des Plugins JACoP (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>) wurde die Korrelation in der Lokalisation

verschiedener Antigensignale anhand des Pearson's Korrelationskoeffizienten (Pearson's correlation coefficient, PCC) ermittelt. Je höher der Wert des Pearson's Korrelationskoeffizienten ist, desto größer ist der Anteil an kolokalisierten Pixeln zweier Gruppen (in diesem Fall zweier verschiedener Antikörper). Bei einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von 1,0 wären 100% der Pixel zwei verschiedener Gruppen/Antikörper kolokalisiert. Bei einem Pearson's Korrelationskoeffizienten von 0 gäbe es keine Überschneidung der Pixelbereiche zweier verschiedener Gruppen/Antikörper. Die ermittelten Pearson's Korrelationskoeffizienten wurden anschließend für die deskriptive und induktive statistische Auswertung verwendet. Diese wurde mit Excel durchgeführt.

Für die Färbungen der iPSC-RPE des Samples B mit Anti- β -Catenin-Antikörpern wurde das Vorgehen etwas abgewandelt: β -Catenin dient als Markierung der Zellmembran in den iPSC-RPE. Nachdem die Fotos in ImageJ in die einzelnen Farbkanäle aufgetrennt wurden, wurden sie in das binary-Format überführt („process -> binary -> make binary“). Anschließend wurde die gesamte Zelle mit dem Freihandwerkzeug ausgeschnitten. Die Orientierung zum Ausschneiden der Zelle erfolgt anhand der β -Catenin-Pixel, die die äußere Zellgrenze darstellen. Anschließend wurden die Pixel der gesamten Zelle gezählt („analyze -> histogram -> list -> Wert für 255 (schwarz) ablesen“). Danach wurde der intrazelluläre Bereich der Zelle ausgeschnitten – also der Bereich innerhalb des durch β -Catenin-Pixel markierten Randbereichs der Zelle. Danach wurden die Pixel im Zytosol gezählt. Die β -Catenin-Pixel der gesamten Zelle wurden ins Verhältnis gesetzt zu den β -Catenin-Pixeln intrazellulär. Anschließend wurde bei den Cav1.3-Pixeln das Verhältnis gebildet zwischen den Pixeln der gesamten Zelle und den Pixeln intrazellulär. Durch den Vergleich der Quotienten (Pixel gesamt / Pixel intrazellulär) von β -Catenin und Cav1.3 kann abgeschätzt werden, wieviel des Cav1.3 in der Zellmembran lokalisiert ist und wieviel sich intrazellulär befindet.

7.4.2. Statistische Auswertung

7.4.2.1. *Statistische Auswertung der Versuche zu Anoctamin-4*

Um fundierte Aussagen über die durchgeführten Versuche zu treffen, wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Färbungen (Samples) durchgeführt. Die insgesamt Anzahl an Zellen pro Antikörperkombination (nach mindestens drei Samples) lag bei mindestens 36 Zellen.

Für jede Antikörperkombination/Gruppe wurden jeweils alle Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) der einzelnen Zellen in Excel-Tabellen gesammelt. Anschließend wurde für jede Antikörperkombination/Gruppe folgende deskriptive Maße (für alle PCC-Werte der einzelnen Zellen) bestimmt: Anzahl der unabhängigen Färbungen (n Samples), Stichprobengröße (n

Zellen), Mittelwert (MW) der PCC-Werte, Standardabweichung (SD, standard deviation), Median der PCC-Werte, Standardfehler (SEM, standard error of the mean), Minimum und Maximum der PCC-Werte, sowie das 25. Perzentil und das 75. Perzentil der einzelnen PCC-Werte.

Aus folgenden Gründen wurden keine Ausreißer-Tests durchgeführt: Die PCC-Werte innerhalb einer Gruppe waren während eines Samples und zwischen den verschiedenen Samples teilweise recht heterogen. Es wurden Versuche in der Grundlagenforschung durchgeführt mit recht ungewissem Ausgang der Versuche. Durch das Eliminieren der Ausreißer werden die Primärdaten verändert und Werte eliminiert, die möglicherweise keine Ausreißer sind, sondern den heterogenen und schwankenden Werten geschuldet sind. Ein weiterer Nachteil eines Ausreißer-Tests besteht darin, dass Annahmen und Voraussetzungen getroffen werden, die für die Nutzer des Tests unbekannt sind.

Eine Normalverteilung der Daten ist eine hinreichende Voraussetzung für die Durchführung von ungepaarten t-Tests. Deshalb wurde vor Durchführung von ungepaarten t-Tests auf das Vorliegen einer Normalverteilung getestet: Die Normalverteilung der einzelnen PCC-Werte wurde für alle Gruppen jeweils mit einem Online-Programm überprüft (Hemmerich, 2018). Die meisten Gruppen zeigten dabei eine Normalverteilung der einzelnen PCC-Werte. Bei den Gruppen ohne Normalverteilung wurde anschließend die Verteilung der einzelnen PCC-Werte in Histogrammen und Density Plots betrachtet – alle Untersuchungsgruppen zeigten in diesen Histogrammen/Density Plots jeweils Verteilungskurven, die einer annähernd Gaußschen Normalverteilungskurve entsprachen. Weiterhin garantiert der Zentrale Grenzwertsatz eine gute Normal-Approximation der tatsächlichen Verteilung, wenn eine hinreichend große Stichprobengröße vorliegt. Mit $n = 36$ bis $n = 181$ bei den untersuchten Gruppen in den Anoctamin-4-Färbungen ist die Stichprobengröße recht groß. Um die Normal-Approximation weiter zu verbessern, wurde die Daten zudem mittels Arcsin-Wurzel Transformation transformiert.

Mithilfe von ungepaarten t-Tests (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=50>) wurde anschließend überprüft, ob die Unterschiede der PCC-Mittelwerte zwischen zwei Gruppen statistisch signifikant sind. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ bewertet. In den Abbildungen werden die p-Werte mithilfe von Abkürzungen und Symbolen wie folgt beschrieben: $> 0,05$ (ns, nicht signifikant), $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****).

Für die Statistik wurden die Originaldaten verwendet (ohne Auf-/Abrundung). Für die Erstellung der Tabellen mit Zusammenfassungen für die Monographie wurde auf-/abgerundet (auf 3 Nachkommaziffern).

7.4.2.2. *Statistische Auswertung der Versuche zu Bestrophin-1*

Die statistische Auswertung für das Bestrophin-1-Projekt erfolgte rein deskriptiv. Es wurden die Stichprobengröße, der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD), der Median, der Standardfehler (SEM), das Mini- und Maximum sowie das 25. und 75. Perzentil berechnet (jeweils bezogen auf die PCC-Werte aller Zellen einer Antikörperkombination). Eine weitere statistische Auswertung erfolgte nicht, da mit nur zwei Färbereihen nicht ausreichend unabhängige Experimente vorliegen.

8. Ergebnisse

8.1. Immunzytochemische Färbungen zu Anoctamin-4 in HEK293-Zellen

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von Anoctamin-4 wurden HEK293-Zellen mit Anoctamin-4-Wildtyp beziehungsweise sieben verschiedenen Anoctamin-4-Mutationen transfiziert und anschließend mit verschiedenen Antikörperkombinationen immunzytochemisch gefärbt (Antikörper aufgelistet in Tabellen 10 und 11 in Kapitel 7.2.4. und 7.2.5.). Der primäre Antikörper rabbit Anti-Anoctamin-4 und der sekundäre Antikörper AF546 Anti-rabbit färben hierbei Anoctamin-4 an (rot in den Abbildungen). Pan-Cadherin stellt einen Zellmembranmarker dar und wird mit dem primären Antikörper mouse Anti-Pan-Cadherin und dem sekundären Antikörper AF647 Anti-mouse angefärbt (grün in den Abbildungen). Mit der Antikörperkombination aus Anti-Anoctamin-4 und Anti-Pan-Cadherin wird die Zellemembranexpression von Anoctamin-4 untersucht (Kapitel 8.1.1. bis 8.1.3.). DAPI ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, bindet an DNA und färbt dadurch die Zellkerne blau an. Weiterhin wurden zwei Antikörper gegen intrazelluläre Organellen gewählt, um die Lokalisation von Anoctamin-4 innerhalb der Zellen zu untersuchen. Mit dem primären Antikörper sheep Anti-early endosome antigen 1 (EEA1) und dem sekundären Antikörper AF488 Anti-sheep werden frühe Endosomen angefärbt (gelb in den Abbildungen). Die Auswertung der Untersuchungen zu Anoctamin-4 in den frühen Endosomen erfolgt in Kapitel 8.1.4. Die Lysosomen werden mit dem primären Antikörper mouse Anti-lysosome-associated membrane protein (Lamp1) und AF647 Anti-mouse als sekundärer Antikörper angefärbt (türkis in den Abbildungen). Die Auswertung der Untersuchungen zu den Lysosomen erfolgt in Kapitel 8.1.5.

Im Folgenden sind für jede Mutation jeweils vier Fotos derselben HEK293-Zelle zu sehen (siehe exemplarisch Abbildung 2). Das linke Foto beinhaltet ausschließlich das Anoctamin-4-Signal (rot). Das zweite Foto von links beinhaltet entweder das Pan-Cadherin-Signal (Grün, Kapitel 8.1.1. bis

8.1.3.) oder das EEA1-Signal (Gelb, Kapitel 8.1.4.) oder das Lamp1-Signal (Türkis, Kapitel 8.1.5.). Das dritte Foto von links stellt das Merge-Foto dar und beinhaltet immer 3 Signale gemeinsam (Anoctamin-4, DAPI und entweder Pan-Cadherin oder EEA1 oder Lamp1). Das rechte Foto stellt die „Colocalized Pixel Map“ dar – was als „Kokolokalisationsabbildung“ übersetzt werden kann. In der Colocalized Pixel Map entspricht rot den Zellbereichen mit ausschließlich Anoctamin-4-Pixeln, grün entspricht den Zellbereichen mit ausschließlich Pan-Cadherin/EEA1/Lamp1-Pixeln, grau entspricht den sich überlappenden Pixeln. Die sich überlappenden Bereiche der Pixel der verschiedenen Farbkanäle können quantitativ erfasst und mit dem Pearson's Korrelationskoeffizient (PCC) berechnet werden. Der PCC beschreibt, wie groß der Anteil an sich überlappenden Pixel zweier verschiedener Strukturen ist. Die Maßstabsanzeige (scale bar) wird jeweils im linken Foto angegeben und entspricht 10µm.

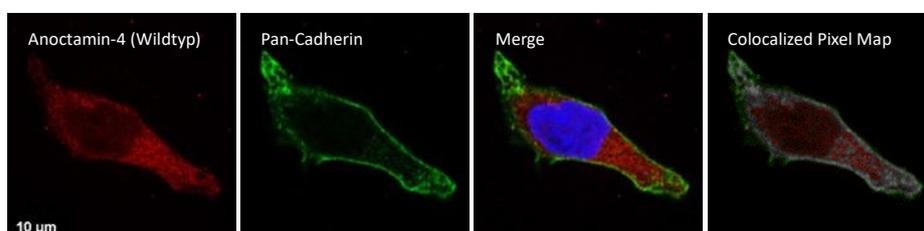


Abbildung 2: Immunzytochemie von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK293-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen Anoctamin-4 (rot), Pan-Cadherin (grün) und DAPI (blau).

Bei den immunzytochemischen Färbungen der HEK293-Zellen nach Anoctamin-4-Transfektion zeigten sich unter dem Mikroskop reich bewachsene Coverslips. Die Zellmorphologie der HEK-Zellen war untereinander recht homogen. Die meisten HEK-Zellen schienen intakt. Die Transfektionseffizienz war hoch. Sie wurde nur qualitativ während des Mikroskopierens erfasst und wurde auf etwa 80% geschätzt. Die Antikörper funktionierten zuverlässig und hatten recht konstante Signalintensitäten, sodass die Laserintensität recht gering eingestellt werden konnte.

Bei der qualitativen Betrachtung der Fotos der immunzytochemischen Färbungen waren Unterschiede zwischen Anoctamin-4-Wildtyp und den einzelnen Mutationen bezüglich ihrer Kokolokalisation zu Pan-Cadherin/EEA1/Lamp1 nicht eindeutig erkennbar. Deshalb erfolgte die quantitative Auswertung der Kokolokalisation mithilfe des Pearson's Korrelationskoeffizienten, mit der die Unterschiede zwischen Anoctamin-4-Wildtyp und den verschiedenen Mutationen besser erfasst werden konnten.

8.1.1. Untersuchungen zur Zellmembranexpression von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK293-Zellen

8.1.1.1. Mittelwerte der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin aus den Samples 1 – 4 zeigen eine große Schwankungsbreite

Der Mittelwert (MW) des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (PCC) zwischen dem Anoctamin-4-Wildtyp und Pan-Cadherin lag nach den Immunzytochemie-Experimenten der Samples 1 – 4 bei 0,564. Der Mittelwert der PCC-Werte zeigte in dieser Experimentreihe jedoch eine große Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Samples (siehe Abbildung 3 und Tabelle 14).

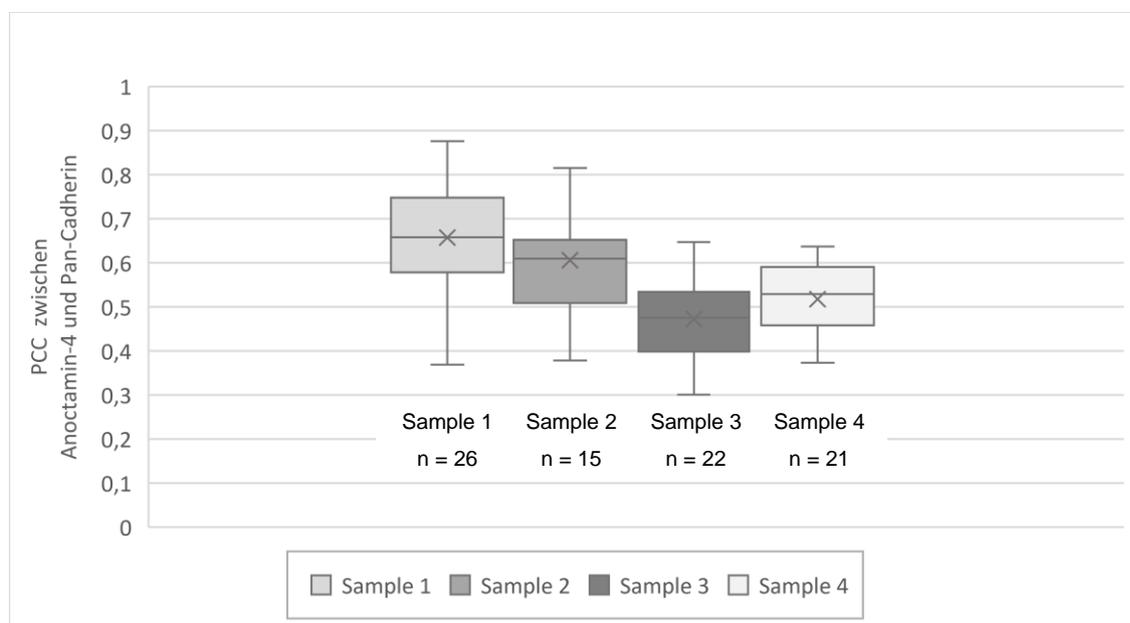


Abbildung 3: Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin von Wildtyp-Anoctamin-4 aus verschiedenen Samples (Sample 1 – 4). Immunzytochemie an mit Anoctamin-4-Wildtyp transfizierten HEK293-Zellen.

Sample	Wildtyp Sample 1	Wildtyp Sample 2	Wildtyp Sample 3	Wildtyp Sample 4
n Zellen	26	15	22	21
Mittelwert	0,657	0,606	0,472	0,517
SD	0,115	0,110	0,095	0,077
Median	0,658	0,609	0,475	0,529
SEM	0,023	0,028	0,020	0,017
Minimum	0,369	0,378	0,301	0,373
25. Perzentil	0,578	0,509	0,399	0,458
75. Perzentil	0,748	0,652	0,534	0,591

Maximum	0,876	0,815	0,647	0,637
----------------	-------	-------	-------	-------

Tabelle 14: Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin von Wildtyp-Anoctamin-4 aus verschiedenen Samples (Sample 1 – 4). Immunzytochemie an mit Anoctamin-4-Wildtyp transfizierten HEK293-Zellen.

Der höchste PCC-Mittelwert der Samples 1 – 4 lag bei 0,657 (Sample 1), der geringste PCC-Mittelwert lag bei 0,472 (Sample 3). Im Bereich zwischen dem höchsten und dem niedrigsten PCC lagen noch die Färbungen mit einem PCC-Mittelwert von 0,606 (Sample 2) und 0,517 (Sample 4). In den Samples 1 – 4 wurde jeweils 200ng DNA zur Transfektion verwendet (entspricht einer Konzentration von 0,66ng DNA/ μ l serumfreies Medium). Die Zeitspanne zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd betrug 24 Stunden.

Es wurden weitere Experimente mit Protokolländerungen angeschlossen (Änderung der Transfektionsmenge und Änderung der Zeitspanne zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen), um mögliche Ursachen der großen Schwankungsbreite in den PCC-Mittelwerten aus den verschiedenen Samples weiter zu untersuchen. Die Betrachtung der Ergebnisse, welchen Einfluss die Protokolländerungen auf die Zellmembranexpression von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK-Zellen hat, erfolgt in den nächsten Kapiteln.

8.1.1.2. Einfluss der Verwendung verschiedener DNA-Mengen zur Transfektion auf die Zellmembranexpression von Anoctamin-4

Um den Einfluss der verwendeten Menge an DNA zur Transfektion auf die Zellmembranexpression von Wildtyp-Anoctamin-4 zu untersuchen, wurde das Protokoll verändert und verschiedene DNA-Mengen transfiziert. So wurden jeweils 200ng DNA (entspricht 0,66ng DNA/ μ l), 100ng DNA (entspricht 0,33ng DNA/ μ l) und 50ng DNA (entspricht 0,166ng DNA/ μ l) in jeder Färbung transfiziert und die Gruppen verschiedener DNA-Mengen miteinander verglichen (siehe Abbildung 4 und Tabelle 15). Zuvor (für die Samples 1 – 4) waren immer 200ng DNA pro Coverslip zur Transfektion verwendet worden (siehe vorheriges Kapitel).

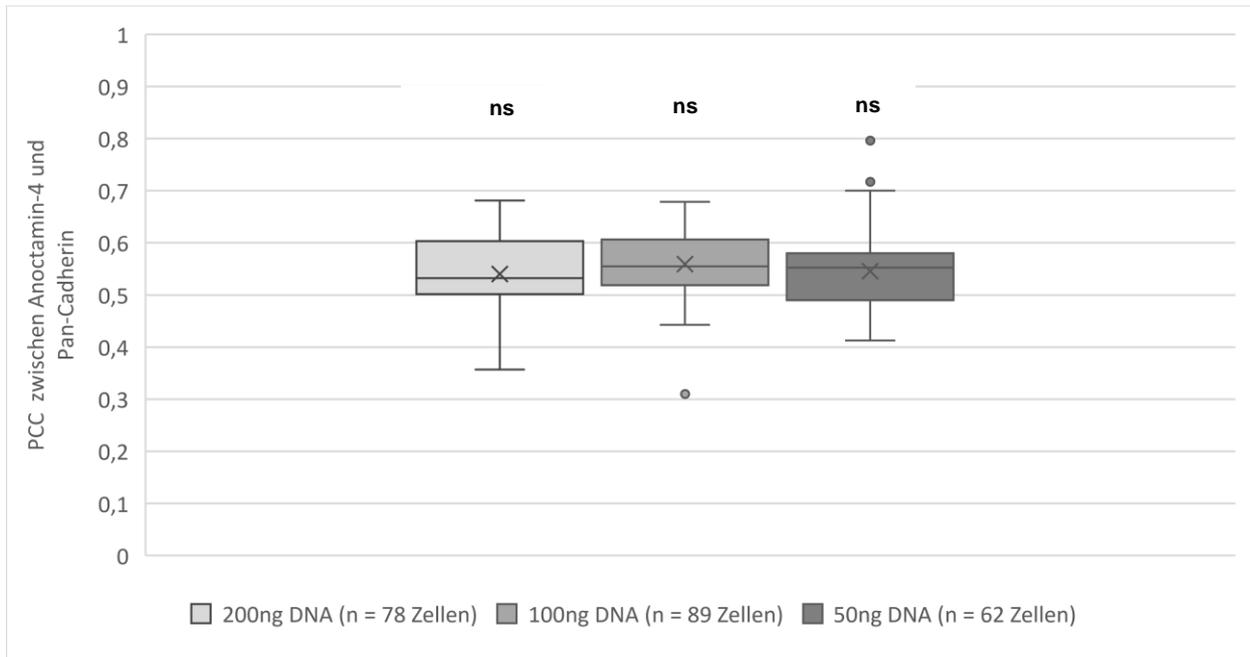


Abbildung 4: Einfluss der Menge an transfizierter DNA auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin bei immunzytochemischen Färbungen an mit Wildtyp-Anoctamin-4 transfizierten HEK293-Zellen. Die Verwendung unterschiedlicher DNA-Mengen zur Transfektion (200ng, 100ng, 50ng) führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den PCC-Mittelwerten der verschiedenen Gruppen (ns = nicht signifikant).

DNA-Menge	200ng (= 0,66ng DNA/ μ l)	100ng (= 0,33ng DNA/ μ l)	50ng (= 0,166ng DNA/ μ l)
n Samples	4	4	3
n Zellen	78	89	62
Mittelwert	0,556	0,561	0,544
SD	0,073	0,074	0,074
Median	0,557	0,563	0,553
SEM	0,008	0,008	0,009
Minimum	0,357	0,31	0,405
25. Perzentil	0,516	0,515	0,493
75. Perzentil	0,616	0,602	0,583
Maximum	0,691	0,736	0,796
Signifikanz	nicht signifikant		

Tabelle 15: Einfluss von verschiedenen Mengen an transfizierter DNA auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin bei immunzytochemischen Färbungen an mit Wildtyp-Anoctamin-4 transfizierten HEK293-Zellen. Der Unterschied zwischen den der PCC-Mittelwerten der drei Gruppen mit verschiedenen Mengen an transfizierter DNA war jeweils statistisch nicht signifikant.

Nach vier Färbungen lag der PCC-Mittelwert (zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin) für 200ng DNA bei 0,556, für 100ng bei 0,561 und für 50ng bei 0,544 (siehe Tabelle 15 und Abbildung 4). Die Unterschiede zwischen den Gruppen (200ng, 100ng, 50ng) waren nach Durchführung

eines ungepaarten t-Tests jeweils nicht statistisch signifikant. Nach diesen Experimenten scheint die Verwendung unterschiedlicher Mengen an DNA zur Transfektion keinen signifikanten Einfluss auf die Zellmembranexpression von Wildtyp-Anoctamin-4 zu haben.

8.1.1.3. Einfluss der Zeitspanne zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen auf die Zellmembranexpression von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK-Zellen

Um den Einfluss der Zeitspanne zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd auf die Zellmembranexpression von Anoctamin4-Wildtyp in HEK293-Zellen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse zweier verschiedener Zeitspannen im Färbeprotokoll miteinander verglichen. Während der Färbungen der Samples 1 – 4 wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Diese Samples wurden verglichen mit Samples, bei denen das Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen auf 12 Stunden verkürzt wurde.

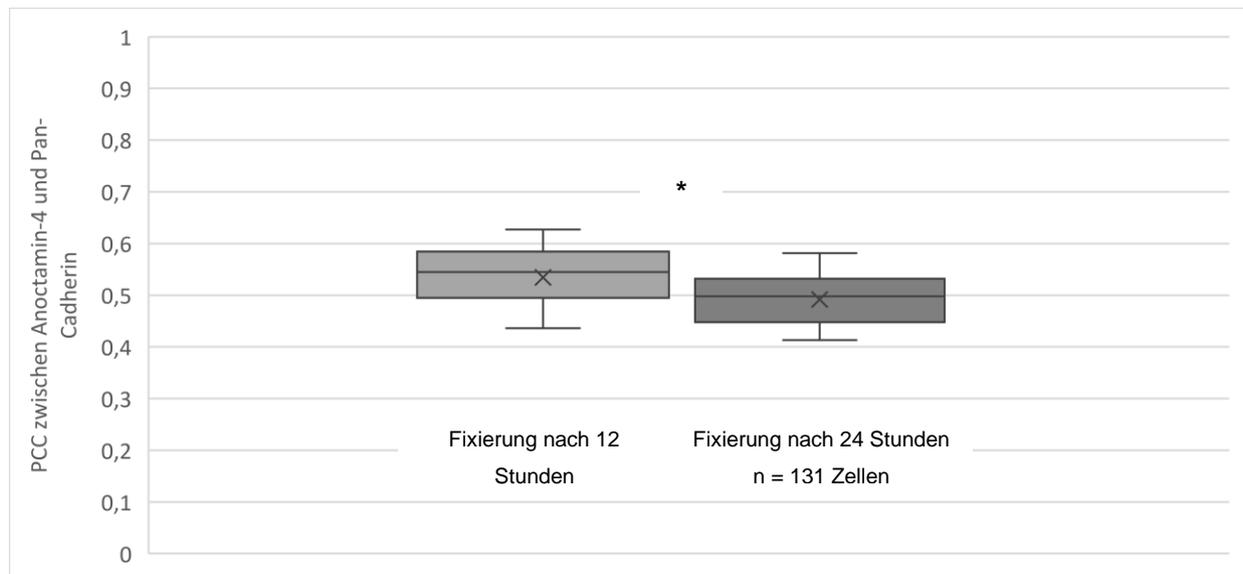


Abbildung 5: Einfluss des Zeitintervalls zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin bei immunzytochemischen Färbungen an mit Wildtyp transfizierten HEK293-Zellen. Der Unterschied zwischen den PCC-Mittelwerten beider Gruppen war statistisch signifikant.

* = p-Wert $\leq 0,05$. h = Stunden.

Zeitpunkt der Fixierung	12h nach Transfektion	24h nach Transfektion
n Samples	8	5
n Zellen	181	131
Mittelwert	0,568	0,542
SD	0,071	0,110
Median	0,566	0,529
SEM	0,005	0,010
Minimum	0,31	0,301
25. Perzentil	0,522	0,465
75. Perzentil	0,615	0,602
Maximum	0,796	0,876
p-Wert / Signifikanz	0,0189 *	

Tabelle 16: Einfluss des Zeitintervalls zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen auf den Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin bei immunzytochemischen Färbungen an mit Wildtyp transfizierten HEK293-Zellen. Der Unterschied zwischen den PCC-Mittelwerten beider Gruppen war statistisch signifikant. * = p-Wert $\leq 0,05$. h = Stunden.

Das kürzere Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung mit PFA führte zu einem höheren Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4-Wildtyp und Pan-Cadherin (siehe Abbildung 5 und Tabelle 16). Der Mittelwert der PCC-Werte lag bei 0,568 für die Gruppe an Zellen, die 12 Stunden nach der Transfektion fixiert wurden. Für die Gruppe aus Zellen, die 24 Stunden nach der Transfektion fixiert wurden, wurde mit 0,542 ein geringerer PCC-Mittelwert errechnet. Nach einem ungepaarten t-Test (nach vorheriger Arcsin-Wurzel-Transformation) war dieser Unterschied statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,0189. Das verkürzte Zeitintervall führte somit zu einer höheren Zellmembranexpression von Anoctamin-4-Wildtyp in HEK293-Zellen.

8.1.1.4. *Insgesamt zeigt sich Anoctamin-4-Wildtyp mit einer Zellmembranexpression von 56%*

Bei der Zusammenfassung aller Färbungen des Anoctamin-4-Wildtyps (verschiedene DNA-Mengen und verschiedene Zeitintervalle zwischen Transfektion und Fixierung) zeigte sich ein Pearson's Korrelationskoeffizient zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin von 0,557 (siehe Tabelle 17). Dies bedeutet, dass in den durchgeführten Experimenten 56% des Anoctamin-4-Wildtyps in der Zellmembran der HEK-Zellen exprimiert war.

Anoctamin-4-Wildtyp in HEK-Zellen: Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin	
n Samples	9
n Zellen	312
Mittelwert	0,557
SD	0,090
Median	0,557
SEM	0,005
Minimum	0,301
25. Perzentil	0,502
75. Perzentil	0,61
Maximum	0,876

Tabelle 17: Kumulative Ergebnisse zu Anoctamin-4-Wildtyp: Immunzytochemie an mit Anoctamin-4-Wildtyp transfizierten HEK293-Zellen mit Betrachtung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin als Zellmembranmarker.

Durch das Anschließen weiterer Experimente nach der ersten Zwischenauswertung der Samples 1 – 4 mit Änderungen im Färbeprotokoll wurden zwei Punkte erreicht:

1) Es wurden mögliche Ursachen der großen Schwankungsbreite in den PCC-Mittelwerten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin der Samples 1 – 4 untersucht. Diese Ursachen werden im Kapitel 9.1.6. diskutiert.

2) Es wurde die Anzahl der insgesamt untersuchten Zellen ($n = 312$) sowie die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente (9 verschiedene Samples) jeweils erhöht (siehe Tabelle 17). Das verleiht der berechneten Zellmembranexpression von 56% des Anoctamin-4-Wildtyps in HEK293-Zellen mehr Validität.

8.1.2. Vergleich von sieben verschiedenen Anoctamin-4-Mutationen mit Wildtyp-Anoctamin-4 hinsichtlich ihrer Expression in der Zellmembran

8.1.2.1. *Vergleich von sieben verschiedenen Anoctamin-4-Mutationen mit Wildtyp-Anoctamin-4 hinsichtlich ihrer Zellmembranexpression bei einem Zeitintervall von 24 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen*

Es wurden sieben verschiedene Anoctamin-4-Mutationen mithilfe der zielgerichteten Mutagenese (site-directed mutagenesis) hergestellt. Die sieben Anoctamin-4-Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Zellmembranexpression immunzytochemisch untersucht und mit dem Wildtyp-Anoctamin-4 verglichen (siehe Abbildung 6).

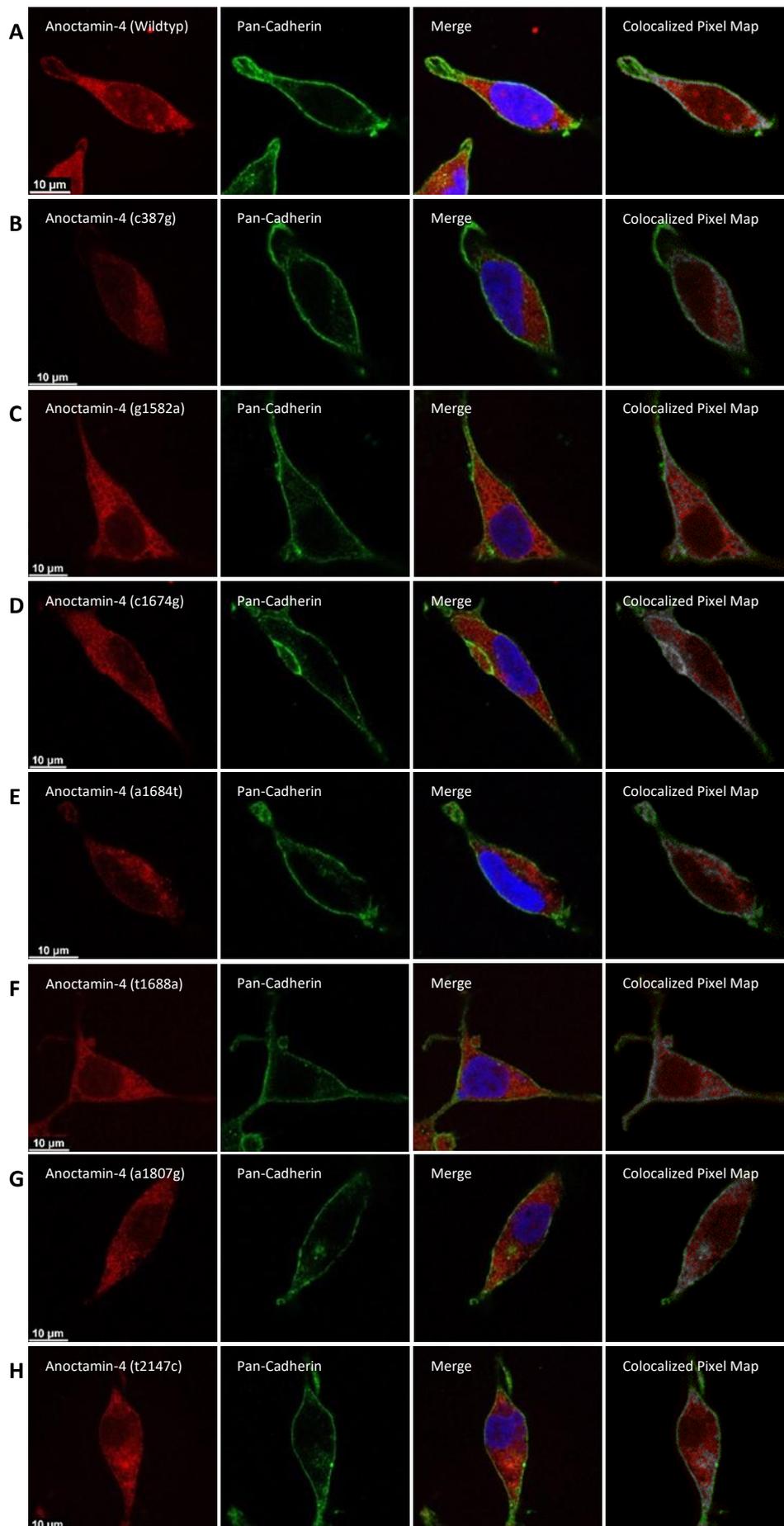


Abbildung 6: Vergleich von sieben verschiedenen Anoctamin-4-Mutanten mit Wildtyp-Anoctamin-4 hinsichtlich ihrer Zellmembranexpression in HEK-Zellen. Immunzytochemie an mit Anoctamin-4 transfizierten HEK293-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen Anoctamin-4 (rot), Pan-Cadherin (grün) und DAPI (blau). Es wird jeweils exemplarisch ein Foto einer Zelle gezeigt für Wildtyp (A), c387g (B), g1582a (C), c1674g (D), a1684t (E), t1688a (F), a1807g (G), t2147c (H).

Bei der qualitativen Betrachtung der Zellen der immunzytochemischen Färbungen waren Unterschiede zwischen Anoctamin-4-Wildtyp und den einzelnen Mutanten bezüglich ihrer Kolokalisation zu Pan-Cadherin nicht eindeutig erkennbar. Erst die quantitative Auswertung der Kolokalisation mithilfe des Pearson's Korrelationskoeffizienten zeigte Unterschiede in der Kolokalisation zwischen dem Wildtyp und den einzelnen Mutanten.

Die Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin der sieben verschiedenen Mutanten wurden mit dem Anoctamin-4-Wildtyp verglichen, um zu untersuchen, inwieweit die Mutationen zu einem Trafficking-Defekt führen, das heißt inwieweit die untersuchten Mutationen zu einer geringeren Zellmembranexpression der mutanten Anoctamin-4-Proteine im Vergleich zum Wildtyp führen. In die Auswertung flossen die Samples 1 – 4 ein, bei denen jeweils 200ng DNA transfiziert wurde und die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion fixiert wurden.

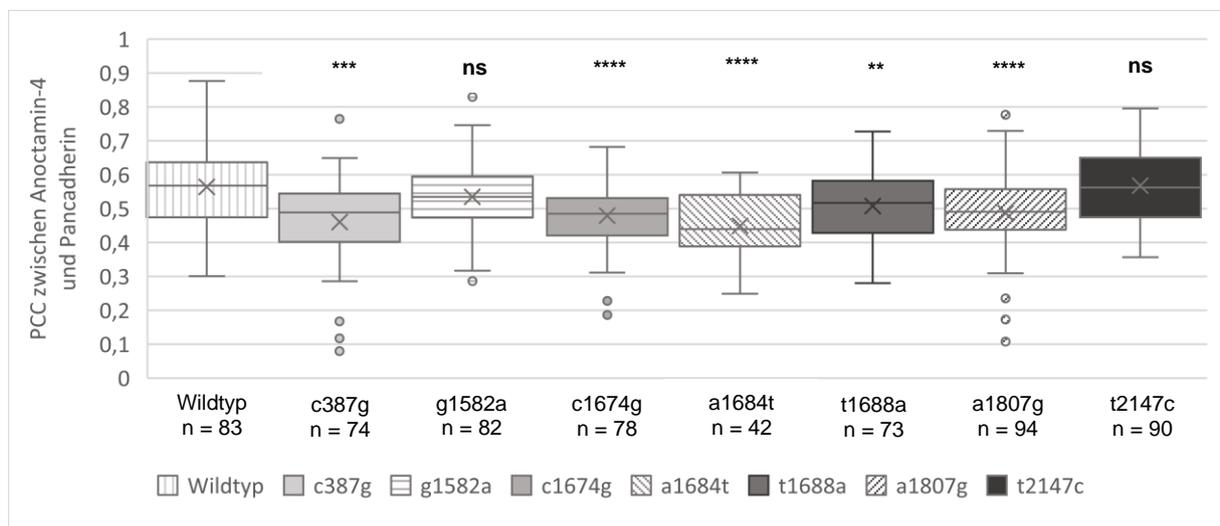


Abbildung 7: Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin vom Anoctamin-4-Wildtyp mit sieben verschiedenen Mutanten. Immunzytochemie an mit Anoctamin-4 transfizierten HEK-Zellen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Werte: > 0,05 (ns, nicht signifikant), ≤ 0,01 (**), ≤ 0,001 (***), ≤ 0,0001(****). n = Anzahl Zellen.

Name	Wildtyp	c387g	g1582a	c1674g	a1684t	t1688a	a1807g	t2147c
n Samples	4	4	4	4	3	4	4	4
n Zellen	83	74	82	78	42	73	94	90
Mittelwert	0,564	0,46	0,534	0,479	0,449	0,508	0,487	0,567
SD	0,125	0,135	0,099	0,087	0,094	0,104	0,121	0,108
Median	0,568	0,489	0,535	0,485	0,440	0,517	0,49	0,562
SEM	0,014	0,016	0,011	0,010	0,015	0,012	0,013	0,011
Minimum	0,301	0,079	0,286	0,186	0,249	0,28	0,108	0,356
25. Perzentil	0,474	0,401	0,473	0,420	0,389	0,429	0,438	0,475
75. Perzentil	0,637	0,544	0,595	0,531	0,541	0,582	0,557	0,65
Maximum	0,876	0,764	0,829	0,682	0,606	0,727	0,777	0,795
p-Wert / Signifikanz		< 0,001 ***	0,0878 ns	< 0,0001 ****	< 0,0001 ****	0,0026 **	< 0,0001 ****	0,8759 ns

Tabelle 18: Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin vom Anoctamin-4-Wildtyp mit sieben verschiedenen Mutanten. Immunzytochemie an mit Anoctamin-4 transfizierten HEK-Zellen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Werte: > 0,05 (ns, nicht signifikant), ≤ 0,01 (**), ≤ 0,001 (***), ≤ 0,0001(****)

Für fünf der sieben Mutanten wurde ein signifikant geringerer PCC-Mittelwert berechnet als für den Wildtyp (Abbildung 6) – die Mutationen c387g (6B), c1674g (6D), a1684t (6E), t1688a (6F) und a1807g (6G) zeigen damit eine signifikant geringere Zellmembranexpression als der Wildtyp (6A).

Die Mutante a1684t hatte mit 0,449 den geringsten PCC-Mittelwert, der PCC war damit auf 80% des PCC-Mittelwertes vom Wildtyp vermindert.

Für die Mutanten g1582a und t2147c ergaben sich keine signifikanten Änderungen des PCC-Mittelwertes im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutante g1582a (Abbildung 6C) zeigte zwar mit einem PCC-Mittelwert von 0,534 einen geringeren PCC als der Wildtyp (95% des PCC-Mittelwertes vom Wildtyp), dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant. Bei der Mutanten t2147c (Abbildung 6H) war der PCC-Mittelwert mit 0,567 minimal höher als der PCC-Mittelwert vom Wildtyp mit 0,564. Der Median der PCC-Werte von t2147c war mit 0,562 dagegen geringer als der Median der PCC-Werte des Wildtyps mit 0,568.

8.1.2.2. Einfluss einer verkürzten Zeitspanne von 12 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung auf den Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin beim Vergleich des Wildtyps mit drei Mutationen

Für die drei Mutanten mit den höchsten PCC-Mittelwerten nach der Zwischenauswertung der Samples 1 – 4 (t2147c mit 0,567, g1582a mit 0,534 und t1688a mit 0,508) wurden zusätzlich noch Färbungen durchgeführt, bei denen die Zellen schon nach 12 Stunden fixiert wurden. Diese Färbungen wurden verglichen mit gleichzeitig durchgeführten Färbungen des Wildtyp-Anoctamin-4 (mit ebenfalls verkürztem Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung). Damit sollte untersucht werden, welchen Einfluss das verkürzte Zeitintervall (zwischen Transfektion und Fixierung) auf den Vergleich des Wildtyps mit den drei Mutanten hinsichtlich ihrer Zellmembranexpression hat.

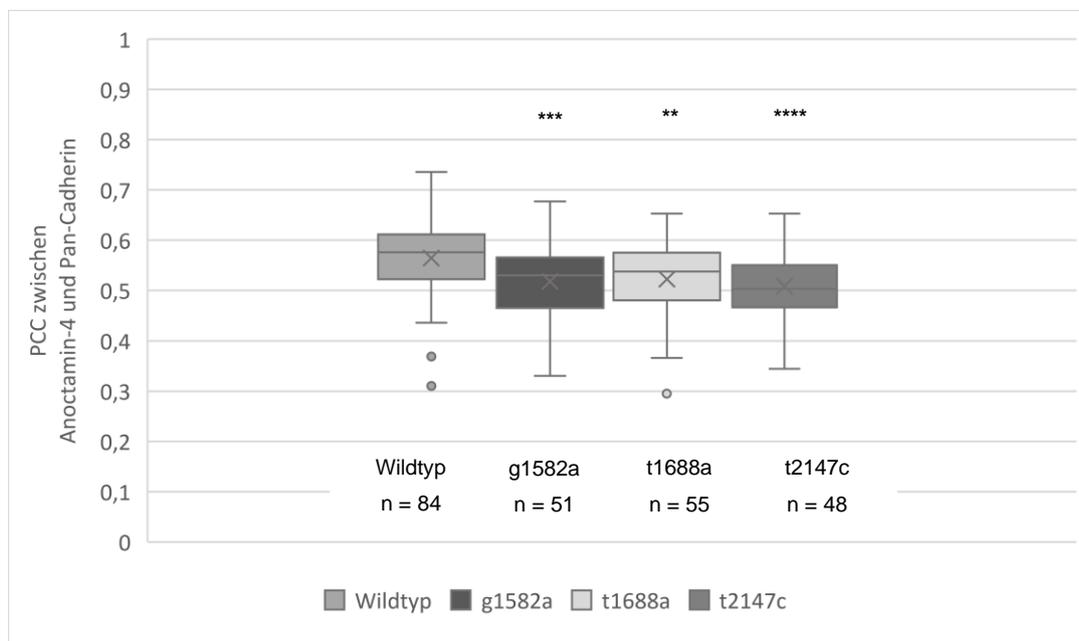


Abbildung 8: Einfluss des verkürzten Zeitintervall von 12 Stunden (zwischen Transfektion und Fixierung) auf den Vergleich des Wildtyps mit drei Mutanten hinsichtlich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin. Immunzytochemie an mit Anoctamin-4 transfizierten HEK-Zellen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Werte: $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****)

Name	Wildtyp	g1582a	t1688a	t2147c
n Samples	4	3	3	2
n Zellen	84	51	55	48
Mittelwert	0,565	0,518	0,523	0,508
SD	0,076	0,074	0,073	0,061
Median	0,576	0,53	0,538	0,504
SEM	0,008	0,010	0,010	0,009
Minimum	0,31	0,33	0,295	0,344
25. Perzentil	0,522	0,459	0,48	0,465
75. Perzentil	0,615	0,566	0,579	0,552
Maximum	0,736	0,677	0,653	0,653
p-Wert / Signifikanz		0,0006 ***	0,0014 **	< 0,0001 ****

Tabelle 19: Einfluss des verkürzten Zeitintervalls von 12 Stunden (zwischen Transfektion und Fixierung) auf den Vergleich des Wildtyps mit drei Mutanten hinsichtlich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin. Immunzytochemie an mit Anoctamin-4 transfizierten HEK-Zellen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Werte: $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****)

Für den Wildtyp ergab sich ein PCC-Mittelwert zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin von 0,565 (siehe Tabelle 19 und Abbildung 8). Die Pearson's Korrelationskoeffizienten für die drei untersuchten Mutanten waren jeweils signifikant geringer als beim Wildtyp: Für t1688a wurde ein PCC-Mittelwert von 0,523 ermittelt, für die Mutante g1582a ein PCC-Mittelwert von 0,518 und für die Mutante t2147c ein PCC-Mittelwert von 0,508. Im Vergleich zur Auswertung der Färbungen mit einem Zeitintervall von 24 Stunden zwischen Transfektion und Fixieren, führte das verkürzte Zeitintervall von 12 Stunden zwischen Transfektion von Fixierung zu einer Vergrößerung der Unterschiede zwischen Wildtyp und den drei Mutanten: Für die beiden Mutanten g1582a und t2147c, bei denen sich bei den Färbungen mit einem Zeitintervall von 24 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung keine signifikanten Unterschiede der PCC-Mittelwerte im Vergleich zum Wildtyp zeigten, wurde beim verkürzten Zeitintervall signifikante Unterschiede der PCC-Mittelwerte zum Wildtyp errechnet. Bei der Mutation t1688a zeigte sich beim verkürzten Zeitintervall ein geringerer p-Wert im Vergleich zum Zeitintervall von 24 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung.

Insgesamt lässt sich damit sagen, dass alle untersuchten Anoctamin-4-Mutationen zu geringeren Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin im Vergleich zum Wildtyp führten. Die Mutanten zeigen also eine leicht verminderte Zellmembranexpression im Vergleich zum Wildtyp in den durchgeführten immunzytochemischen Färbungen.

8.1.3. Experimente mit Natriumphénylbutyrat als Chaperon mit der Frage nach einem verbesserten Transport mutierter Anoctamin-4-Proteine in die Zellmembran

Ziel der Experimente mit Applikation von 4PBA war es, zu untersuchen, ob 4PBA bei den Anoctamin-4-Mutationen einen geeigneten Chaperon darstellt und zu einem verbesserten Transport der mutanten und fehlgefalteten Anoctamin-4-Proteine in die Zellmembran führt. Dazu wurden während der Samples 2 – 4 pro Mutation jeweils ein Coverslip mit HEK-Zellen mit 4PBA (in serumhaltigem Kulturmedium) inkubiert und ein Coverslip ohne 4PBA-Zusatz im serumhaltigen Kulturmedium inkubiert. Die Applikation von 4PBA erfolgte acht Stunden nach der Transfektion, in einer Konzentration von 2,5mM und für eine Inkubationsdauer von 16 Stunden. Es wurden die Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin errechnet und jeweils die Gruppen mit und ohne Inkubation mit 4PBA verglichen.

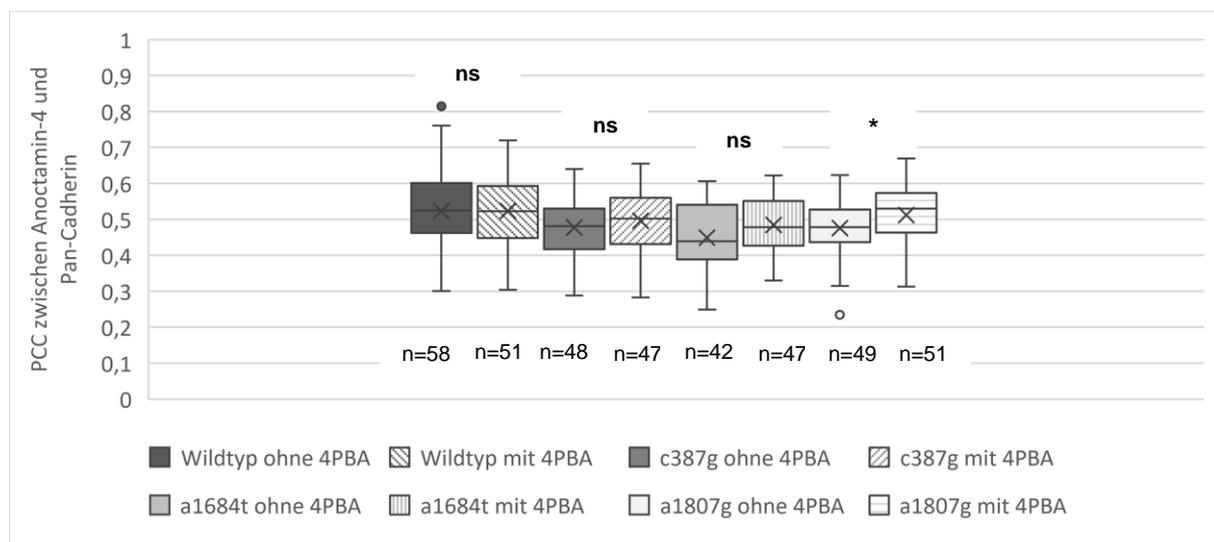


Abbildung 9: Einfluss von Natriumphénylbutyrat (4PBA) auf die Zellmembranexpression mutanter Anoctamin-4-Proteine. Immunzytochemie an mit Anoctamin-4-Wildtyp und Anoctamin-4-Mutationen transfizierten HEK293-Zellen und Berechnung des Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin. Darstellung der Anoctamin-4-Varianten, bei denen 4PBA zu einer Steigerung des PCC-Mittelwertes zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin führte. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich der Zellen mit und ohne 4PBA-Inkubation für die jeweiligen Mutanten und für den Wildtyp. p-Werte: > 0,05 (ns, nicht signifikant), ≤ 0,05 (*). n = Anzahl der Zellen.

Lediglich bei der Mutante a1807g führte die Inkubation mit 4PBA zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des PCC-Mittelwertes zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin, also zu einer höheren Zellmembranexpression, im Vergleich zu den Versuchen ohne 4PBA-Inkubation (siehe Abbildung 9). Der PCC-Mittelwert erhöhte sich durch 4PBA von 0,475 auf 0,512. Beim Wildtyp und bei den zwei Mutanten c387g und a1684t führte 4PBA ebenfalls zu einem höheren PCC-Werten (siehe Abbildung 9). Der Unterschied zwischen Inkubation mit 4PBA und ohne 4PBA war für diese jedoch jeweils nicht statistisch signifikant. Beim Wildtyp erhöhte sich der PCC-Mittelwert lediglich von 0,523 auf 0,524. Für die Mutante c387g erhöhte sich der PCC-Mittelwert nach 4PBA-

Inkubation von 0,477 auf 0,496 und bei der Mutante a1684t führte die 4PBA-Inkubation zu einer Erhöhung des PCC-Mittelwertes von 0,449 auf 0,484.

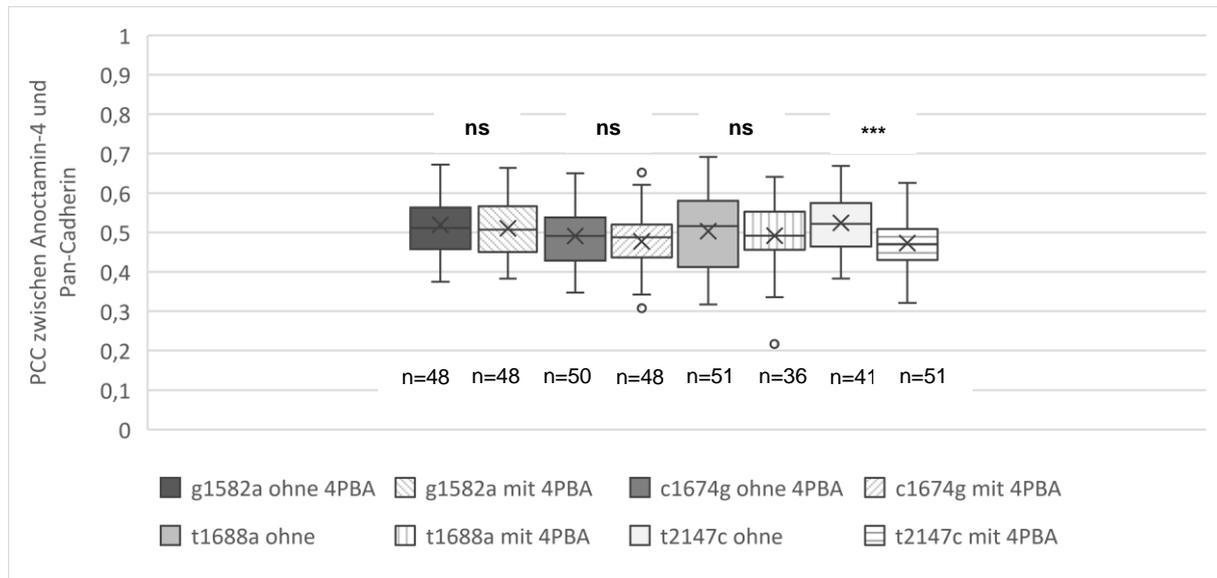


Abbildung 10: Einfluss von Natriumphénylbutyrat (4PBA) auf die Zellmembranexpression mutanter Anoctamin-4-Proteine. Immunzytochemie an mit Anoctamin-4-Mutationen transfizierten HEK293-Zellen und Berechnung des Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin. Darstellung der Anoctamin-4-Varianten, bei denen 4PBA zu einer Reduktion des PCC-Mittelwertes zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin führte. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich der Zellen mit und ohne 4PBA-Inkubation für die jeweiligen Mutanten. p-Werte: > 0,05 (ns, nicht signifikant), ≤ 0,001 (***). n = Anzahl der Zellen.

Weiterhin gab es vier Mutanten, bei denen die Inkubation mit 4PBA zu einer Reduktion des Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin führte (siehe Abbildung 10): Für die drei Mutanten g1582a, c1674g und t1688a war die Reduktion der PCC-Mittelwerte statistisch nicht signifikant. Denn bei der Mutante g1582a reduzierte sich der PCC-Mittelwert von 0,519 auf 0,51, bei c1674g war eine Reduktion von 0,491 auf 0,477 zu verzeichnen und bei t1688a sank der PCC-Mittelwert von 0,503 auf 0,492. Bei der Mutante t2147c führte die Inkubation mit 4PBA zu einer statistisch signifikanten Reduktion des PCC-Mittelwertes, von 0,524 auf 0,473.

8.1.4. Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Anoctamin-4 durch Färbungen mit einem Antikörper gegen frühe Endosomen

Neben den Experimenten zur Expression von Anoctamin-4 in der Zellmembran, wurden Färbungen zur intrazellulären Lokalisation von Anoctamin-4 durchgeführt. Dabei wurde die Assoziation von Anoctamin-4-Wildtyp und den verschiedenen Mutanten zu den frühen Endosomen (dieses Kapitel) und zu den Lysosomen (folgendes Kapitel) untersucht, um Erkenntnisse über die Lokalisation von Anoctamin-4 im endolysosomalen System zu gewinnen. Mit der Verwendung des primären Antikörper sheep Anti-early endosome antigen 1 (EEA1) und

dem sekundären Antikörper AF488 anti-sheep werden frühe Endosomen angefärbt (gelb in der Abbildung 11). Analog zu den Färbungen mit dem Anti-Pan-Cadherin-Antikörper ist im linken Foto Anoctamin-4 (rot) zu sehen. Im zweiten Foto von links sind die frühen Endosomen durch den EEA1-Antikörper angefärbt (gelb). Im dritten Foto von links befindet sich das Merge-Foto (enthält das Anctamin-4-Signal, das EEA1-Signal und DAPI zum Anfärben der Zellkerne). Ganz rechts befindet sich das Foto mit der Colocalized Pixel Map (Kokolisationsabbildung) – hier entsprechen die roten Pixel den Bereichen mit ausschließlich Anoctamin-4-Pixeln, die grünen Bereiche enthalten ausschließlich EEA1-Pixel und die grauen Pixel entsprechen den Bereichen, in denen sich Anoctamin-4 und frühe Endosomen gemeinsam befinden (kolokalisiert sind). Für die Färbungen mit dem Anti-EEA1-Antikörper wurden für die Transfektion 100ng DNA verwendet (entspricht 0,33ng DNA/ μ l) und das Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen betrug 12 Stunden.

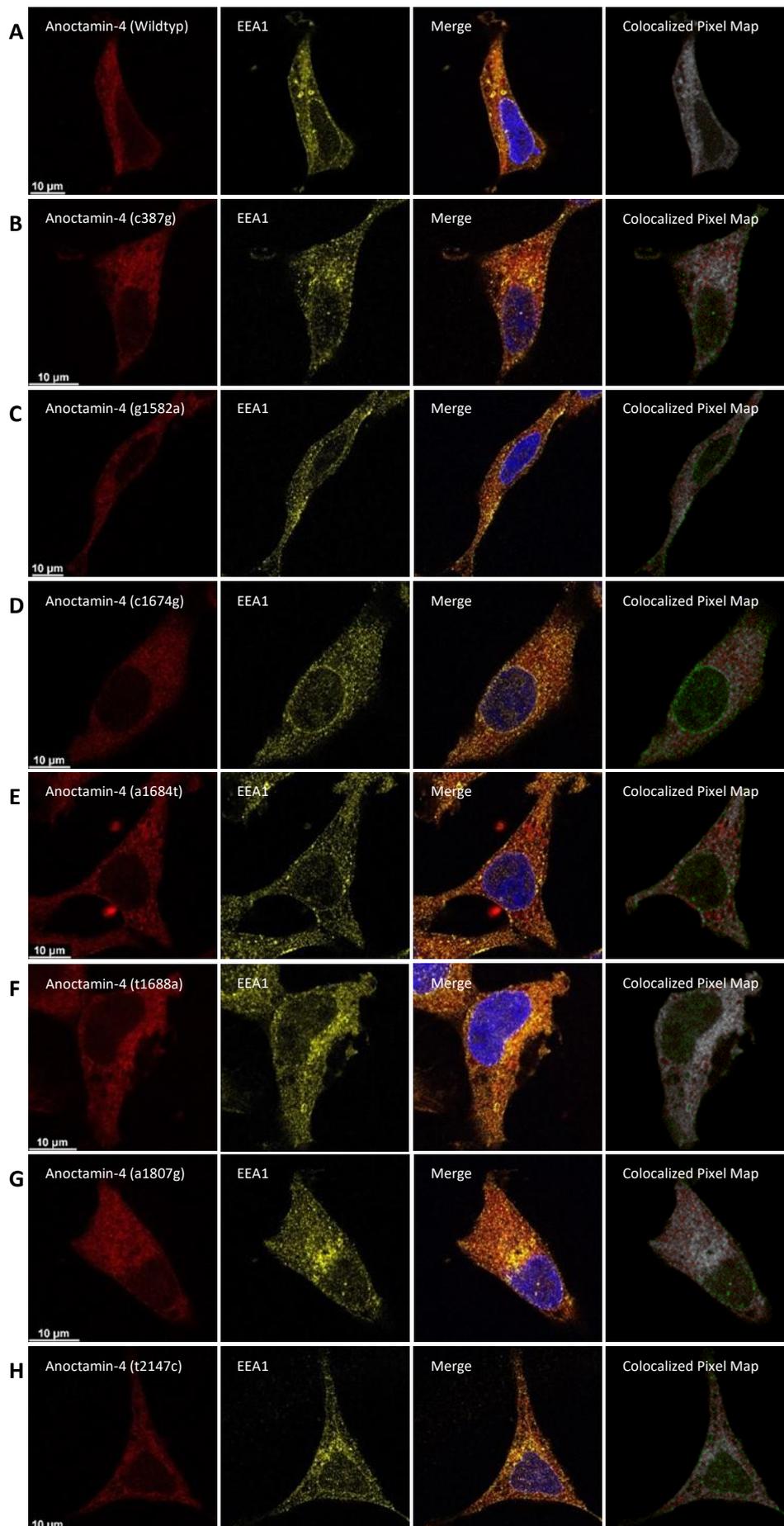


Abbildung 11: Anoctamin-4 in frühen Endosomen bei immunzytochemischen Färbungen an HEK293-Zellen nach Transfektion von Anoctamin-4-Wildtyp (A) und sieben Anoctamin-4-Mutationen (B – H) unter Verwendung von Antikörpern gegen Anoctamin-4 (rot), EEA1 als Marker für frühe Endosomen (gelb) und DAPI (blau). Wildtyp (A), c387g (B), g1582a (C), c1674g (D), a1684t (E), t1688a (F), a1807g (G), t2147c (H).

Ähnlich wie bei den Pan-Cadherin-Färbungen waren bei der rein visuellen Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop/ auf den Fotos keine eindeutigen Unterschiede erkennbar zwischen Anoctamin-4-Wildtyp und den einzelnen Mutanten bezüglich ihrer Kolokalisation zu EEA1 (Abbildung 11). In der quantitativen Auswertung der Kolokalisation zwischen Anoctamin-4 und EEA1 mithilfe des Pearson's Korrelationskoeffizienten zeigten sich aber Unterschiede in der Kolokalisation zwischen dem Wildtyp und den einzelnen Mutanten (Abbildung 12 und Tabelle 20).

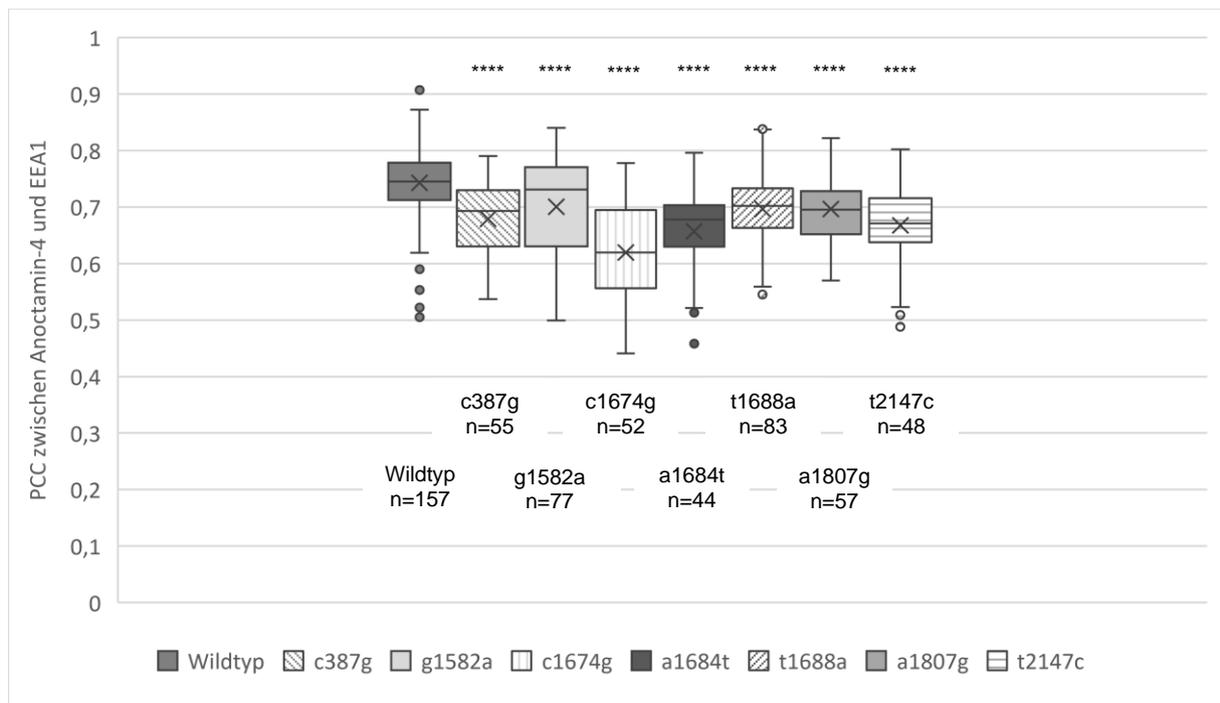


Abbildung 12: Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und EEA1 (als Marker für frühe Endosomen) von Anoctamin-4-Wildtyp im Vergleich zu sieben Anoctamin-4-Mutanten. Immunzytochemie an HEK293-Zellen transfiziert mit Anoctamin-4-Wildtyp und sieben verschiedenen Mutationen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Werte: $\leq 0,0001$ (****). n = Anzahl Zellen.

Name	Wildtyp	c387g	g1582a	c1674g	a1684t	t1688a	a1807g	t2147c
n Samples	7	3	5	3	3	5	3	4
n Zellen	157	55	77	52	44	83	57	48
Mittelwert	0,742	0,679	0,700	0,62	0,657	0,697	0,696	0,668
SD	0,058	0,062	0,097	0,093	0,069	0,060	0,054	0,078
Median	0,745	0,693	0,731	0,620	0,678	0,702	0,695	0,671
SEM	0,005	0,008	0,011	0,013	0,010	0,007	0,007	0,011
Minimum	0,505	0,537	0,499	0,441	0,458	0,545	0,57	0,488
25. Perzentile	0,712	0,63	0,631	0,556	0,63	0,663	0,652	0,638
75. Perzentile	0,779	0,73	0,771	0,695	0,703	0,733	0,728	0,716
Maximum	0,907	0,79	0,84	0,778	0,796	0,838	0,822	0,802
p-Wert / Signifikanz		<0,0001 ****						

Tabelle 20: Darstellung der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und EEA1 (als Marker für frühe Endosomen) von Anoctamin-4-Wildtyp im Vergleich zu sieben Anoctamin-4-Mutanten. Immunzytochemie an HEK293-Zellen transfiziert mit Anoctamin-4-Wildtyp und sieben verschiedenen Mutationen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Wert $\leq 0,0001$ (****). n = Anzahl Zellen.

Die Mittelwerte der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und dem Marker für frühe Endosomen EEA1 waren mit 0,742 (Wildtyp) und 0,62 bis 0,700 (sieben verschiedene Mutanten) deutlich höher als die PCC zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin. Etwa 74% des Anoctamin-4-Wildtyps ist mit EEA1 assoziiert – liegt also im Bereich der frühen Endosomen vor.

Alle sieben Mutationen führten zu einer signifikanten Reduktion der PCC-Mittelwerte im Vergleich zum Wildtyp – nach Durchführung der ungepaarten t-Tests (nach zuvor durchgeführter Arcsinus-Wurzel-Transformation) ergaben sich jeweils p-Werte von $< 0,0001$. Die mutanten Anoctamin-4-Proteine liegen also im geringeren Maße in den frühen Endosomen vor.

Die Mutante g1582a (Abbildung 11C) zeigte mit einem PCC-Mittelwert von 0,7 den höchsten PCC aller untersuchten Mutanten. Trotzdem ergab ich ein signifikant geringerer PCC-Mittelwert im Vergleich zum Wildtyp. Auch bei den Färbungen mit Pan-Cadherin-Antikörpern stellte die Mutante g1582a sich mit einem der höchsten PCC-Mittelwerte dar. Für die Mutante c1674g (Abbildung 11D) wurde ein PCC-Mittelwert von 0,62 errechnet, c1674g hat damit den geringsten PCC-Mittelwert aller untersuchten Mutanten. Auch bei den Färbungen mit Pan-Cadherin-Antikörpern ergab sich bei c1674g ein eher geringer PCC-Mittelwert im Vergleich zu den anderen Mutanten. Für die Mutante t2147c ergab sich ein PCC-Mittelwert von 0,668. Während bei den Färbungen mit Pan-Cadherin-Antikörpern sich bei der Mutante t2147c einer der höchsten PCC-

Mittelwerte zeigte, stellt sie bei den Färbungen mit EEA1-Antikörpern die Mutante mit dem drittniedrigsten PCC-Mittelwert dar.

8.1.5. Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Anoctamin-4 durch Färbungen mit einem Antikörper gegen Lysosomen

Mit der Verwendung des primären Antikörpers mouse Anti-lysosome-associated membrane protein (Lamp1) und des sekundären Antikörpers AF647 Anti-mouse wurden Lysosomen angefärbt (türkis in Abbildung 13). In der Abbildung 13 ist im linken Foto jeweils Anoctamin-4 (rot) zu sehen. Im zweiten Foto von links sind die Lysosomen durch den Lamp1-Antikörper angefärbt (türkis). Im dritten Foto von links befindet sich das Merge-Foto (enthält das Anoctamin-4-Signal, das Lamp1-Signal und DAPI zum Anfärben der Zellkerne). Rechts befindet sich das Foto mit der Colocalized Pixel Map (Kolokalisationsabbildung) – hier entsprechen die roten Pixel den Bereichen mit ausschließlich Anoctamin-4-Pixeln, die grünen Bereiche enthalten ausschließlich Lamp1-Pixel und die grauen Pixel entsprechen den Bereichen, in denen sich Anoctamin-4 und Lysosomen gemeinsam befinden – also kolokalisiert sind.

Für die Färbungen mit dem Anti-Lamp1-Antikörper wurden für die Transfektion 100ng DNA verwendet und das Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen betrug 12 Stunden.

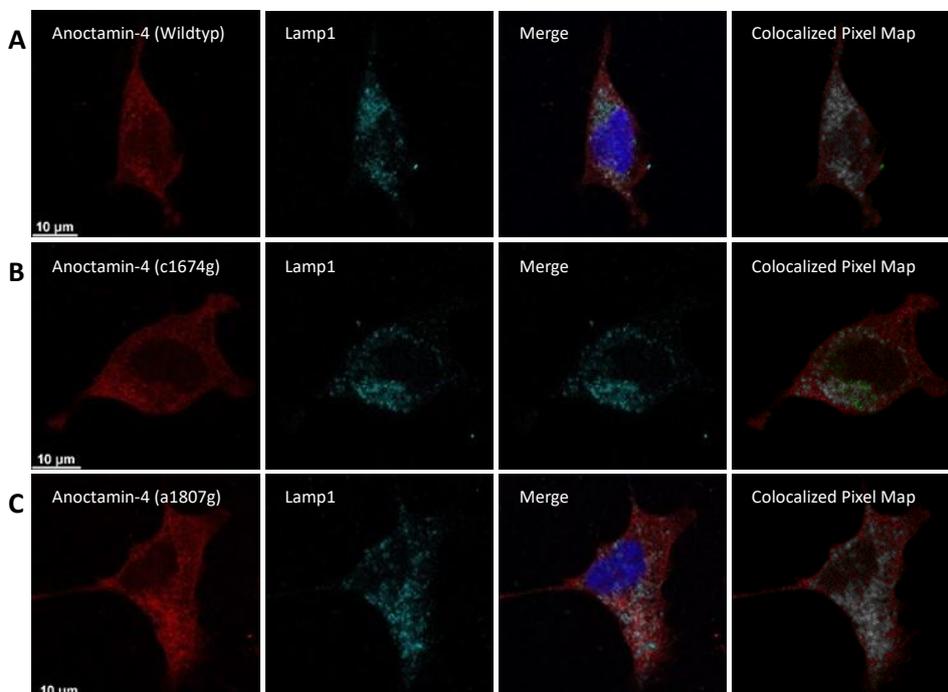


Abbildung 13: Anoctamin-4 in Lysosomen bei immunzytochemischen Färbungen an HEK293-Zellen nach Transfektion von Anoctamin-4-Wildtyp (A), sowie den Anoctamin-4-Mutationen c1674g (B) und a1807g (C) unter Verwendung von Antikörpern gegen Anoctamin-4 (rot), Lamp1 als Marker für Lysosomen (türkis) und DAPI (blau).

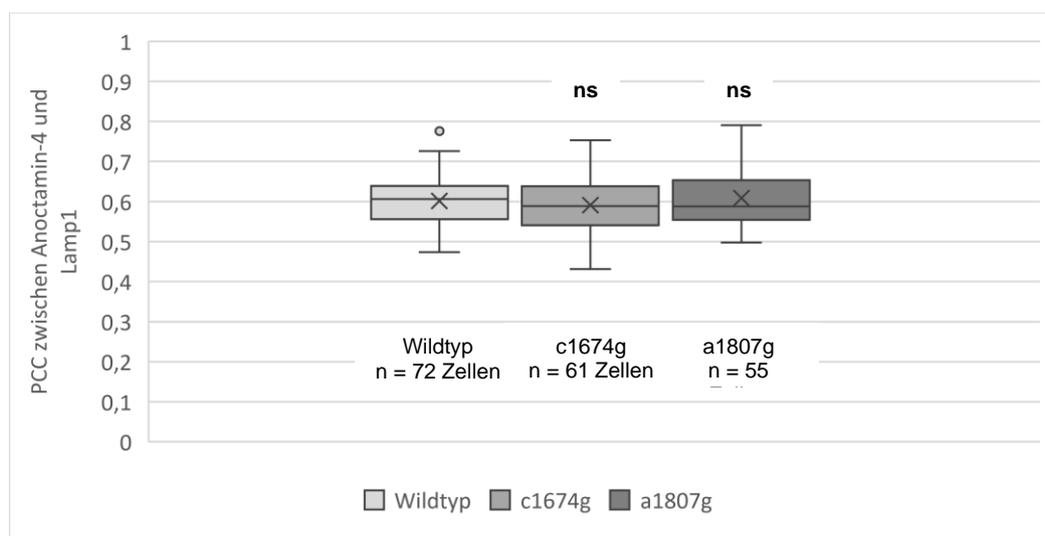


Abbildung 14: Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Lamp1 (als Marker für Lysosomen) von Anoctamin-4-Wildtyp im Vergleich zu zwei Anoctamin-4-Mutanten. Immunzytochemie an HEK293-Zellen transfiziert mit Anoctamin-4-Wildtyp und zwei verschiedenen Mutationen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Werte > 0,05 (ns, nicht signifikant).

Name	Wildtyp	c1674g	a1807g
n Samples	4	3	3
n Zellen	72	61	55
Mittelwert	0,601	0,591	0,608
SD	0,064	0,066	0,069
Median	0,607	0,589	0,588
SEM	0,008	0,008	0,009
Minimum	0,474	0,431	0,498
25. Perzentile	0,555	0,537	0,551
75. Perzentile	0,639	0,639	0,654
Maximum	0,776	0,753	0,791
p-Wert / Signifikanz		0,3662 ns	0,5442 ns

Tabelle 21: Vergleich der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und Lamp1 (als Marker für Lysosomen) von Anoctamin-4-Wildtyp im Vergleich zu zwei Anoctamin-4-Mutanten. Immunzytochemie an HEK293-Zellen transfiziert mit Anoctamin-4-Wildtyp und zwei verschiedenen Mutationen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des PCC-Mittelwertes der jeweiligen Mutante zum Wildtyp. p-Wert > 0,05 (ns, nicht signifikant).

Für Anoctamin-4-Wildtyp und die beiden Anoctamin-4-Mutationen c1674g und a1807g wurde jeweils der Pearson's Korrelationskoeffizient zwischen Anoctamin-4 und Lamp1 errechnet, um Erkenntnisse zur Assoziation der Mutanten zu den Lysosomen im Vergleich zum Wildtyp zu gewinnen.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den beiden untersuchten Mutanten. Für Anoctamin-4-Wildtyp (Abbildung 13A) betrug der Mittelwert des Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Lamp1 0,601. Für c1674g (Abbildung 13B) wurde ein PCC-Mittelwert von 0,591 errechnet und für die Mutante a1807g (Abbildung 13C) ein PCC-Mittelwert von 0,608 – jeweils ein nicht signifikanter Unterschied zum Wildtyp. So scheint es, dass die untersuchten Anoctamin-4-Mutationen keinen Einfluss haben auf den Anteil an Anoctamin-4-Proteinen, die sich in den Lysosomen befinden.

8.1.6. Färbungen mit einem Antikörper gegen cleaved Caspase 3

Mit der Verwendung eines Antikörpers gegen cleaved Caspase-3 sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass Mutationen im Anoctamin-4-Gen zu einer erhöhten Apoptoserate im Vergleich zum Wildtyp-Anoctamin-4 führen könnten. Insgesamt konnte kein eindeutiger Unterschied zwischen Positivkontrollen (mit Cobalt-II-Chlorid oder Wasserstoffperoxid) und Negativkontrollen (ohne primäre Antikörper) festgestellt werden und somit keine Aussagen zur Apoptose anhand der Versuche gezogen werden. Cobalt-II-Chlorid oder Wasserstoffperoxid wurden appliziert, um Zellstress zu generieren und damit mehr apoptotische Zellen auf den Coverslips zu erzeugen.

Es gelang in mehreren Versuchen nicht, unter Verwendung von Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Konzentrationen eine Positivkontrolle (HEK-Zellen mit eindeutiger Anfärbung von cleaved Caspase 3) zu generieren. Die Inkubation mit Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von 1 mmol/l bewirkte ein Absterben fast aller Zellen. Die toten Zellen blieben nicht am Coverslip haften und wurden während des Färbens vom Coverslips weggespült. In einer geringeren Konzentration (< 100µmol/l) blieben die Zellen während des Färbens erhalten. Unter dem Mikroskop war ein schwaches homogenes Signal bzw. Hintergrundrauschen für Caspase 3 detektierbar, das bei allen Zellen ähnlich war und das vor allem von der Stärke des Lasers abhing (je stärker der Laser eingestellt wurde, desto stärker wurde das cleaved Caspase-3-Signal, sodass je nach Laserstärke entweder alle Zellen negativ waren oder alle Zellen positiv). Somit konnte keine Positivkontrolle in Form von eindeutig Caspase 3-positiven Zellen generiert werden.

Deshalb wurde anschließend versucht, mit Cobalt-II-Chlorid, einem anderen Zellgift, Positivkontrollen zu erzeugen.

600µM Cobalt-II-Chlorid für 12 Stunden Inkubation stellte für die HEK-Zellen ein starkes Zellgift dar: Unter dem Lichtmikroskop waren vor dem Fixieren sehr viele Zellen kreisrund gewesen, was für einen ungesunden und gestressten Zustand der Zellen sprach. Viele Zellen waren bereits tot und hatten sich deshalb vom Coverslip abgelöst und schwammen im Medium oberhalb des

Coverslips. Nach der immunzytochemischen Färbung waren unter dem Fluoreszenzmikroskop nur vereinzelte Zellkerne sichtbar, die restlichen Zellen waren durch das Cobalt gestorben und blieben deshalb während des Färbens und Waschens nicht auf dem Coverslip haften. Ein Farbsignal für AF546 (sekundärer Antikörper für rabbit anti-cleaved Caspase-3) war bei den wenigen übrig gebliebenen Zellen nicht detektierbar.

Anschließend wurden die Zellen vor der Färbung mit der halbierten Cobalt-II-Chlorid-Konzentration (300µM) inkubiert. Bei der Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop zeigten sich die Cobalt-exponierten Zellen in reduzierter Anzahl und mit heterogenen Zellkernen. Die Coverslips ohne Cobaltexposition zeigten Zellen in höherer Anzahl und mit homogen runden Zellkernen der Zellen. Die Morphologie der Zellkerne nach Cobaltexposition ließen auf gestresste und ungesunde Zellen deuten. Alle Coverslips (Positivkontrollen nach Cobaltexposition, Negativkontrollen ohne primäre Antikörper und reguläre Färbung ohne Cobaltexposition) zeigten ein ähnliches Bild bezüglich des AF546-Signals – einerseits gab es größere Bereiche auf den Coverslip mit fast keinem AF546-Signal bzw. nur einem sehr schwachen Hintergrundrauschen; andererseits gab es aber auch größere Bereiche des Coverslips mit einem sehr starken Hintergrundrauschen von AF546 und einzelnen Zellen mit einem intensiven AF546-Signal. Weiterhin stellten sich die Bereiche mit übereinanderliegenden Zellen mit stärkeren AF546-Signalen dar. Es wurden verschiedene Expositionszeiten für 300µM Cobalt ausprobiert (1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 36h), die alle zu ähnlichen AF546-Signalen führten.

Da sich die Negativkontrollen, die Positivkontrollen und die Coverslips mit regulärer Färbung ohne Cobaltexposition Zellen alle ähnlich darstellten, können die beschriebenen Beobachtungen nicht einer erfolgreichen Färbung mit anti-cleaved Caspase 3 zugeschrieben werden, sondern müssen eher auf eine Bindung des primären und/oder sekundären Antikörpers an unspezifische zytosolische Bindungsstellen zurückgeführt werden.

8.2. Immunzytochemische Färbungen zu Bestrophin-1 in iPSC-RPE

Bei der Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen wurden zum einen iPSC-RPE-Zellen eines Patienten verwendet, der an Morbus Best erkrankt ist (Pat.-iPSC) und zum anderen wurden iPSC-RPE-Zellen eines gesunden Spenders verwendet. Die iPSC-RPE-Zellen des gesunden Spenders wurden mit Bestrophin-1-Wildtyp oder mit der Bestrophin-1-Mutation T6P transfiziert, die Patientenzellen wurden nicht mit exogenem Bestrophin-1 transfiziert (da sie schon die endogene Mutation D302A tragen).

Die durchgeführten Experimente zu Bestrophin-1 in iPSC-RPE besitzen nur eine begrenzte Aussagekraft. Denn es lassen sich nur zwei unabhängige Färbungen (Sample A und Sample B)

mit ausreichender Qualität verwerten. Für quantitative Bewertungen wären mindestens drei unabhängige Färbungen notwendig gewesen. Ein weiteres Problem der vorhandenen Färbereien stellt deren Heterogenität dar: die zwei Samples erfolgten an unterschiedlichen iPSC-RPE-Chargen, die Färbungen wurden unter zwei verschiedenen Mikroskopen betrachtet und das Mikroskopieren erfolgte durch zwei verschiedene Personen. Die Zellmorphologie unterscheidet sich zwischen den beiden Samples. Zudem variiert die Qualität und die Morphologie innerhalb desselben Samples etwas – zwischen den verschiedenen Mutationen, zwischen den verschiedenen Antikörperkombinationen und teilweise auch innerhalb der Zellen auf einem einzigen Filter.

Die Transfektion der iPSC-RPE erfolgte, nachdem sich ein konfluenten Monolayer ausgebildet hatte (nach 72 Stunden). Dies wurde unter einem einfachen Lichtmikroskop beurteilt. Teilweise lösten sich die Zellen von den Filtern während der Färbungen, trotz vorsichtigem Pipettierens – sichtbar dadurch, dass sich die makroskopisch sichtbaren Pigmentierungen verschoben. Das erklärt die Beobachtung, dass unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zellen meist einzeln vorlagen und nicht mehr in einem konfluenten Monolayer. So konnten teilweise nur wenige Zellen einer Antikörperkombination in die Auswertung einfließen.

Zudem war die Transfektionseffizienz (bei Transfektion von exogenem Bestrophin-1-Wildtyp und der Mutation T6P) recht gering. Sie wurde während des Mikroskopierens abgeschätzt und wird auf nur etwa 10-20% geschätzt. Das transfizierte Plasmid enthält neben Bestrophin-1 auch GFP (grün fluoreszierendes Protein). GFP-positive Zellen können dementsprechend als erfolgreich transfiziert eingestuft werden.

Beim Mikroskopieren der Zellebenen in unmittelbarer Nähe zum Filter (dicht am Objektträger) erschwerte der Filter das Mikroskopieren etwas, da der Filter in diesen Ebenen ein starkes Hintergrundrauschen verursacht oder den Hintergrund insgesamt trübe macht.

8.2.1. Qualitative Beurteilung der Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen

8.2.1.1. Sample A – qualitative Beurteilung der Immunzytochemie

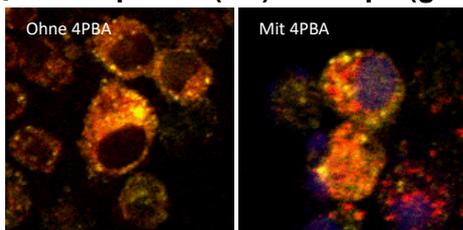
Bei Sample A wurden ausschließlich Patienten-iPSC-RPE-Zellen gefärbt. Mit der Antikörperkombination mouse Anti-Bestrophin-1 (primärer Antikörper) und AF546 Anti-mouse (sekundärer Antikörper) wurde das endogene und mutationstragende Bestrophin-1 angefärbt (rot in den Abbildungen). Der L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.3$, ein Interaktionspartner von Bestrophin-1, wurde mit dem primären Antikörper mouse Anti- $Ca_v1.3$ und dem sekundären Antikörper AF546 Anti-mouse detektiert (ebenfalls rot). Da die Antikörper Anti-Bestrophin-1 und Anti- $Ca_v1.3$ jeweils Maus-Antikörper sind und deshalb nicht mit verschiedenen sekundären Antikörpern angefärbt

werden können, erfolgte entweder das Anfärben von Bestrophin-1 oder von $Ca_v1.3$ und keine gleichzeitige Färbung beider Antigene.

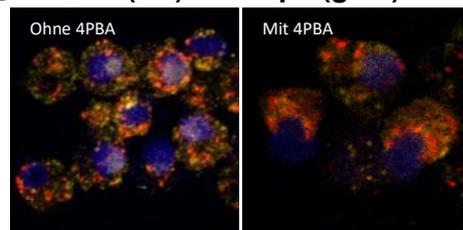
Der sekundäre Antikörper AF647 Anti-rabbit (gelb in den Abbildungen) detektiert drei verschiedene primäre Antikörper (nicht gleichzeitig): 1) Die frühen Endosomen werden durch den primären Antikörper rabbit Anti-EEA1 (early endosome antigen-1) und AF647 als sekundären Antikörper erfasst, 2) Die Lysosomen werden durch den primären Antikörper rabbit Anti-Lamp1 (lysosome-associated membrane protein 1) und den sekundären Antikörper AF647 detektiert, 3) der primäre Antikörper rabbit Anti- β -Catenin dient als Membranmarker und wird ebenfalls durch den sekundären Antikörper AF647 erfasst. DAPI interkaliert mit der DNA und färbt dadurch die Zellkerne blau an.

Es werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Merge-Fotos gezeigt, die alle drei Farbsignale gleichzeitig in einem Bild beinhalten.

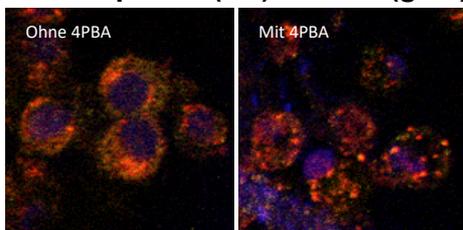
A Bestrophin-1 (rot) – Lamp1 (gelb)



C $Ca_v1.3$ (rot) – Lamp1 (gelb)



B Bestrophin-1 (rot) – EEA1 (gelb)



D $Ca_v1.3$ (rot) – β -Catenin (gelb)

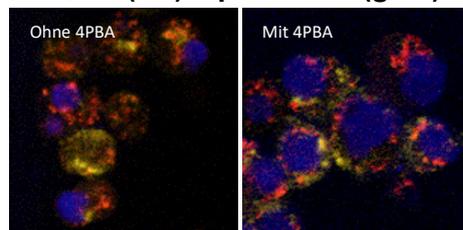


Abbildung 15: Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen eines Patienten mit endogener Bestrophin-1-Mutation. Verwendung verschiedener Antikörperkombinationen: gegen Bestrophin-1 und den Lysosomenmarker Lamp1 (A), gegen Bestrophin-1 und den Marker für frühe Endosomen EEA1 (B), gegen den L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.3$ und Lamp1 (C), gegen $Ca_v1.3$ und den Membranmarker β -Catenin (D). Jeweils links sind Zellen dargestellt ohne Applikation von Natriumphénylbutyrat (4PBA) als Chaperon und jeweils rechts sind Zellen dargestellt, die mit 4PBA inkubiert wurden.

Insgesamt zeigten sich die iPSC-RPE innerhalb der Färbereihe des Samples A (Abbildung 15) recht homogen. Sie präsentierten sich mit einer ovalen Form – vergleichbar mit der in der Literatur beschriebenen hexagonalen Form beziehungsweise kubischen Zellmorphologie in der dreidimensionalen Betrachtung (siehe Kapitel 4.3.6.). Das Kern-Plasma-Verhältnis war sehr groß, sodass der Zellkern sich meist etwa über die Hälfte der gesamten Zelle erstreckte. Die einzelnen Zellen lagen dicht beieinander. Morphologisch entsprach das Bild einem Monolayer. Jedoch

waren die Zellen innerhalb des Monolayers nicht so gleichmäßig pflastersteinartig angeordnet, wie es in den mikroskopischen Fotos in der Literatur beschrieben wird (siehe Kapitel 4.3.6.).

Das β -Catenin-Signal soll eigentlich als Membranmarker dienen – es soll die Zellgrenze gut markieren sowie bei der Erfassung des Anteils von Cav1.3 in der Zellmembran helfen. β -Catenin zeigte sich in Sample A (Abbildung 15D) jedoch eher diffus im Zytoplasma verteilt und nicht ausschließlich in der Zellmembran.

8.2.1.2. Sample B – qualitative Beurteilung der Immunzytochemie

Insgesamt stellten sich die Zellen des Samples B heterogener dar im Vergleich zu den recht homogenen oval-hexagonalförmigen Zellen des Samples A. So waren viele oval bis hexagonal förmige Zellen vertreten (beispielsweise in den Abbildungen 16D (T6P mit 4PBA bei der Antikörperkombination Bestrophin-1-Lamp1), 17A (Wildtyp mit 4PBA bei der Antikörperkombination Bestrophin-1-EEA1) oder 17E (Patientenzellen mit 4PBA bei der Antikörperkombination Bestrophin-1-EEA1). Es zeigten sich aber auch Färbungen, bei denen in unterschiedlichem Ausmaß auch Zellen mit einer länglichen ovalen Form zu sehen waren (beispielsweise Abbildung 16B, Wildtyp-Bestrophin-1 mit 4PBA mit der Antikörperkombination Bestrophin-1-Lamp1), teilweise könnte man die Zellen als spindelförmig beschreiben.

Bei der Färbung des Samples B hat das Anfärben der Zellkerne mit DAPI nicht funktioniert. Die Laserstärke musste stark hochreguliert werden, um ein Signal zu erhalten. Anschließend war die gesamte Zelle blau gefärbt durch DAPI und nicht ausschließlich der Zellkern. Zudem war das Hintergrundrauschen recht ausgeprägt. Deshalb wurde der DAPI-Kanal teilweise entfernt. Die nicht erfolgreiche Anfärbung der Zellkerne durch DAPI erschwert die Beurteilung der Zellen etwas, da der Zellkern nur erahnt werden konnte, weil der Bereich des Zellkerns vom Signal für Bestrophin-1/ Cav1.3 ausgespart wird.

8.2.1.2.1. Antikörperkombination Bestrophin-1-Lamp1 (qualitative Auswertung Sample B)

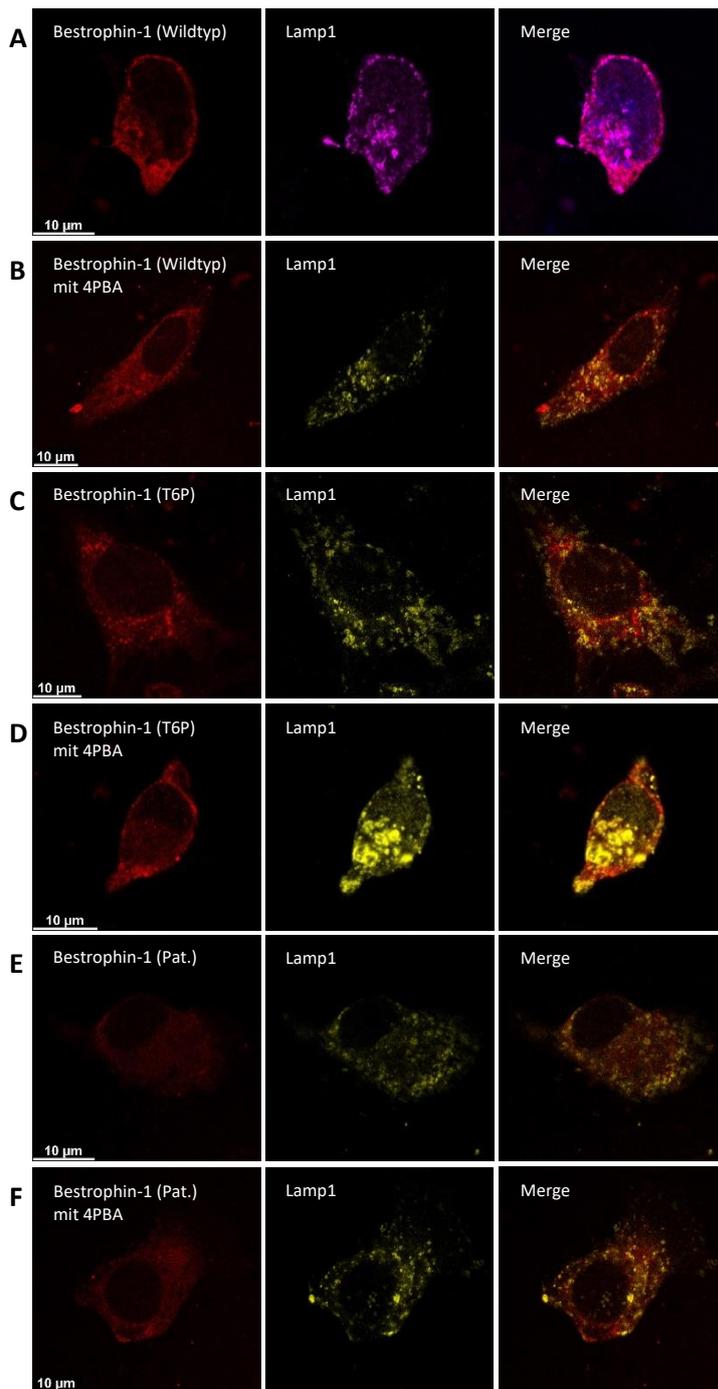


Abbildung 16: Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen Bestrophin-1 (jeweils linkes Foto) und Lamp1 als Lysosomenmarker (mittiges Foto). Das rechte Foto (Merge) enthält alle Farbsignale – Bestrophin-1 (rot), Lamp1 (gelb, beziehungsweise pink in Abbildungsreihe A) sowie DAPI als Zellkernfärbung. Da die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI nicht gut funktionierte, wurde der DAPI-Farbkanal teilweise entfernt (B – F). Dargestellt werden iPSC-RPE nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (A und B) oder der Bestrophin-1-Mutation T6P (C und D) und Patientenzellen (Pat.) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (E und F). Es wird jeweils eine Zelle nach Behandlung mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (4PBA, in B, D und F) und eine Zelle ohne Applikation von 4PBA (A, C, und E) gezeigt.

8.2.1.2.2. Antikörperkombination Bestrophin-1-EEA1 (qualitative Auswertung Sample B)

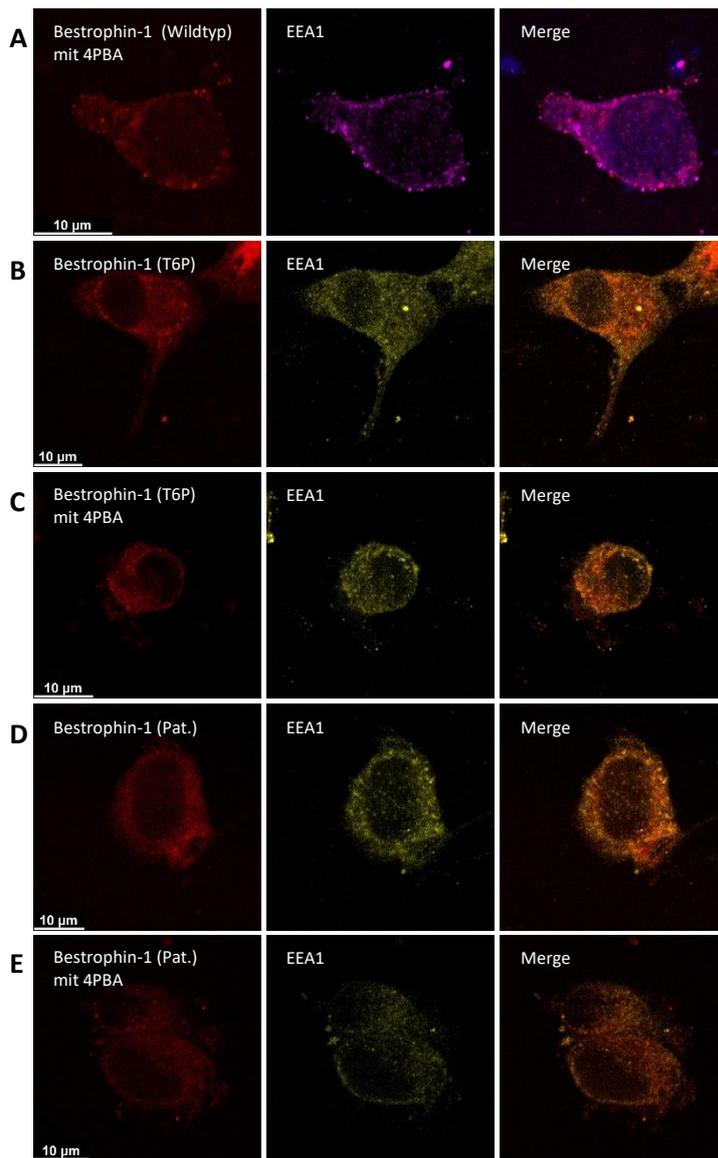


Abbildung 17: Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen Bestrophin-1 (jeweils linkes Foto) und EEA1 als Marker für frühe Endosomen (mittiges Foto). Das rechte Foto (Merge) enthält alle Farbsignale – Bestrophin-1 (rot), EEA1 (gelb, beziehungsweise pink in Abbildungsreihe A) sowie DAPI als Zellkernfärbung. Da die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI nicht gut funktionierte, wurde der DAPI-Farbkanal teilweise entfernt (B – E). Dargestellt werden iPSC-RPE nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (A) oder der Bestrophin-1-Mutation T6P (B und C) und Patientenzellen (Pat.) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (D und E). Es wird jeweils eine Zelle nach Behandlung mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (4PBA, in A, C und E) und eine Zelle ohne Applikation von 4PBA (B und D) gezeigt. Bei der Färbung der Zellen transfiziert mit Wildtyp und ohne Applikation von 4PBA waren keine GFP-positiven Zellen auffindbar gewesen, weshalb die Färbung nicht ausgewertet werden konnte und hierzu keine Fotos eingefügt wurden.

Bei Betrachtung der Fotos der Abbildungen 16 und 17 fällt auf, dass die Lamp1-Signale eher als Granula vorliegen, und die EEA1-Signale gleichmäßiger und recht homogen über die gesamte Zelle verteilt sind.

8.2.1.2.3 Antikörperkombination Cav1.3-Lamp1 (qualitative Auswertung Sample B)

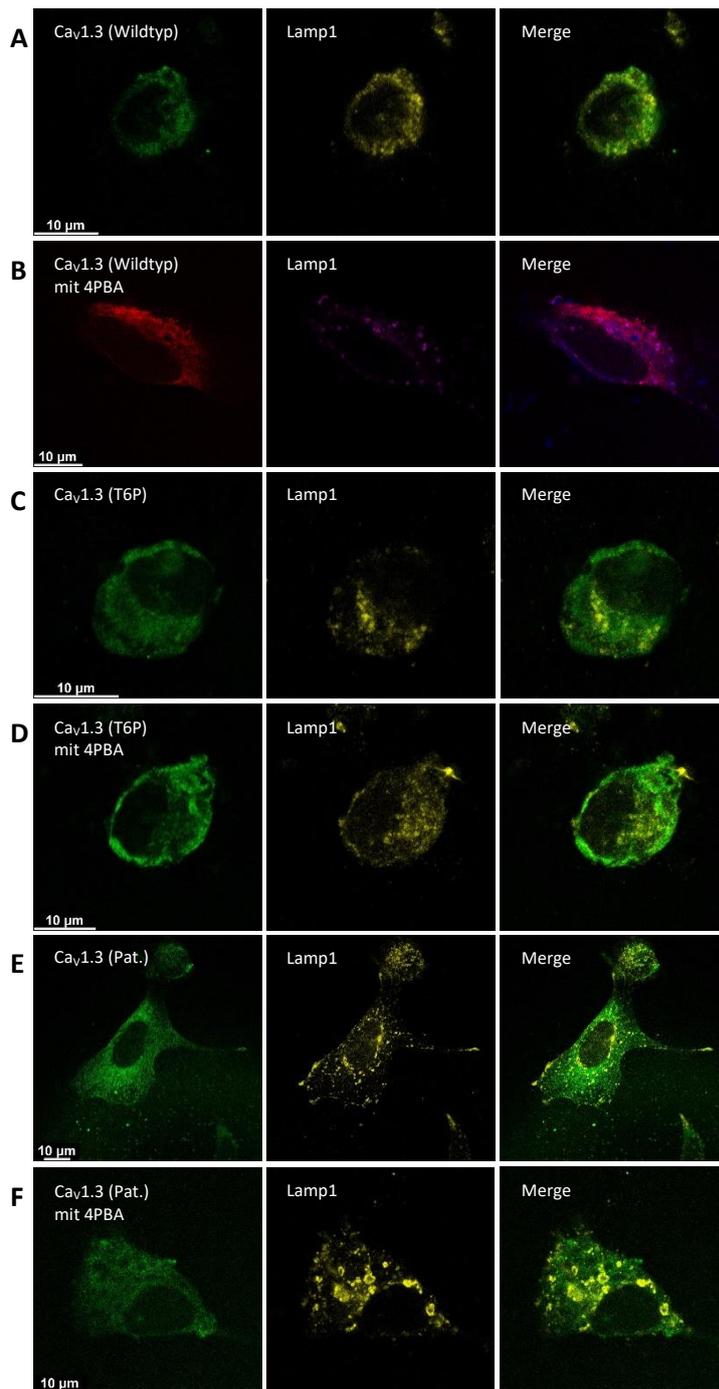


Abbildung 18: Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen den L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.3$ (jeweils linkes Foto) und gegen den Lysosomenmarker Lamp1 (mittiges Foto). Das rechte Foto (Merge) enthält alle Farbsignale – $Ca_v1.3$ (grün, beziehungsweise rot in Abbildungsreihe B), Lamp1 (gelb, beziehungsweise pink in Abbildungsreihe B) sowie DAPI als Zellkernfärbung. Da die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI nicht gut funktionierte, wurde der DAPI-Farbkanal teilweise entfernt (A, C, D, E, F). Färbung von $Ca_v1.3$ nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (A und B) oder der Mutation T6P (C und D), beziehungsweise bei Patientenzellen mit endogener Mutation. Inkubation der iPSC-RPE mit Natriumphenylybutyrat (4PBA) als Chaperon in Abbildungen B, D und F. Keine Applikation von 4PBA in den Abbildungen A, C und E.

8.2.1.2.4 Antikörperkombination Ca_v1.3- β-Catenin (qualitative Auswertung Sample B)

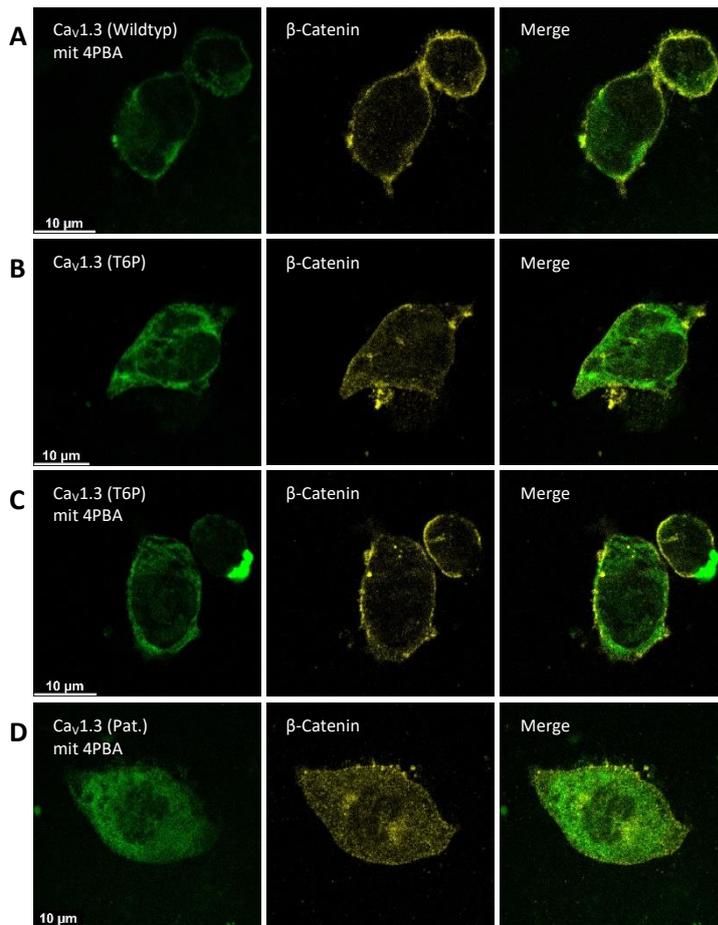


Abbildung 19: Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen den L-Typ-Calciumkanal Ca_v1.3 (jeweils linkes Foto) und gegen den Membranmarker β-Catenin (mittiges Foto). Das rechte Foto (Merge) enthält beide Farbsignale – Ca_v1.3 (grün) und β-Catenin (gelb). Da die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI nicht gut funktionierte, wurde der DAPI-Farbkanal entfernt. Färbung von Ca_v1.3 nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (A) oder der Mutation T6P (B und C), beziehungsweise bei Patientenzellen mit endogener Mutation (D). iPSC-RPE nach Inkubation mit Natriumphénylbutyrat (4PBA) als Chaperon in Abbildungen A, C und D. Keine Applikation von 4PBA bei iPSC-RPE in Abbildung B.

β-Catenin soll einen Zellmembranmarker darstellen für die iPSC-RPE. Die Qualität der β-Catenin-Färbungen variiert von Zelle zu Zelle. Teilweise bildet β-Catenin einen gut abgrenzbaren Saum im Bereich der Zellmembran, und es ist nur wenig β-Catenin-Signal intrazellulär zu finden, wie beispielsweise bei den exemplarischen Abbildungen vom Wildtyp mit 4PBA (19A) und bei T6P mit 4PBA (19C). Bei anderen Zellen ist deutlich mehr β-Catenin intrazellulär zu finden, wie bei T6P ohne 4PBA (19B) oder bei den Patientenzellen mit 4PBA (19D).

Bei der Färbung vom Wildtyp ohne 4PBA-Applikation waren auf dem Filter keine GFP-positiven Zellen auffindbar gewesen, weshalb die Färbung nicht in die Auswertung fließen konnte. Die Färbung der Patientenzellen ohne 4PBA-Applikation war ebenfalls nicht erfolgreich gewesen aufgrund von Problemen mit dem Fluoreszenz Mounting Medium.

Hinweis: Zellen wie in Abbildungsreihe 19C oben rechts in den Fotos flossen nicht mit in die quantitativen Auswertungen ein, das Signal scheint ein Artefakt zu sein durch beispielsweise nicht homogen verteilte Antikörper.

8.2.2. Quantitative Beurteilung der Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen

Auch wenn aufgrund unzureichender Datendichte (wie oben beschrieben) eine fundierte statistische Aussage zu Bestrophin-1 in iPS-RPE-Zellen nicht möglich ist, sollen die errechneten Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen den verschiedenen Antikörpern dargestellt werden. Zur Berechnung der Pearson's Korrelationskoeffizienten wurden pro Zelle immer diejenige optische Schicht (Z-Ebene) gewählt, in der sich die Zelle und der Zellkern jeweils möglichst groß darstellen als Korrelat dafür, dass die Zelle etwa in ihrer Mitte geschnitten/betrachtet wird.

Da die Daten aus Sample A und Sample B sich deutlich voneinander unterscheiden, werden sie getrennt betrachtet, im Kapitel 8.2.2.1. das Sample A und im Kapitel 8.2.2.2. das Sample B. Zu beachten bei allen Werten beider Samples ist, dass nur eine einzige Färbereihe vorliegt und die Anzahl der betrachteten Zellen teilweise sehr gering ist. Aus diesem Grund erfolgte keine statistische Auswertung der Samples A und B, da mit jeweils nur einer Färbung keine valide Aussage aus statistischen Tests getroffen werden kann. Wenn die Pearson's Korrelationskoeffizienten gegeneinander verglichen werden, kann kein Bezug zur Signifikanz erfolgen, da keine statistischen Tests durchgeführt worden sind.

8.2.2.1. Sample A – quantitative Beurteilung der Immunzytochemie

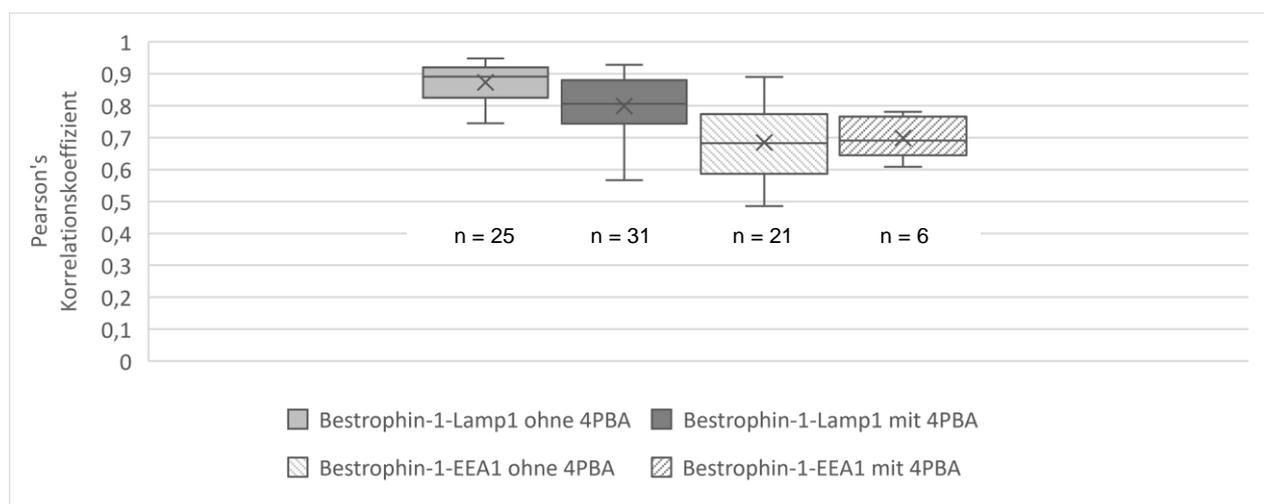


Abbildung 20: Bestrophin-1 in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A): Immunzytochemie und Berechnung der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Bestrophin-1 und dem Lysosomenmarker Lamp1 (linke Boxen) beziehungsweise zwischen Bestrophin-1 und dem Marker für frühe Endosomen EEA1 (rechte Boxen). Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung. n = Anzahl Zellen.

Antikörperkombination	Bestrophin-1-Lamp1 ohne 4PBA	Bestrophin-1-Lamp1 mit 4PBA	Bestrophin-1-EEA1 ohne 4PBA	Bestrophin-1-EEA1 mit 4PBA
n Samples	1	1	1	1
n Zellen	25	31	21	6
Mittelwert	0,873	0,798	0,685	0,698
SD	0,055	0,088	0,103	0,066
Median	0,891	0,806	0,683	0,691
SEM	0,011	0,016	0,023	0,027
Minimum	0,745	0,567	0,486	0,609
25. Perzentil	0,825	0,744	0,587	0,645
75. Perzentil	0,92	0,88	0,774	0,766
Maximum	0,948	0,928	0,89	0,781

Tabelle 22: Bestrophin-1 in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A). Immunzytochemie und Berechnung der Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Bestrophin-1 und dem Lysosomenmarker Lamp1 (linke Spalten) beziehungsweise zwischen Bestrophin-1 und dem Marker für frühe Endosomen EEA1 (rechte Spalten). Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphenybutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung.

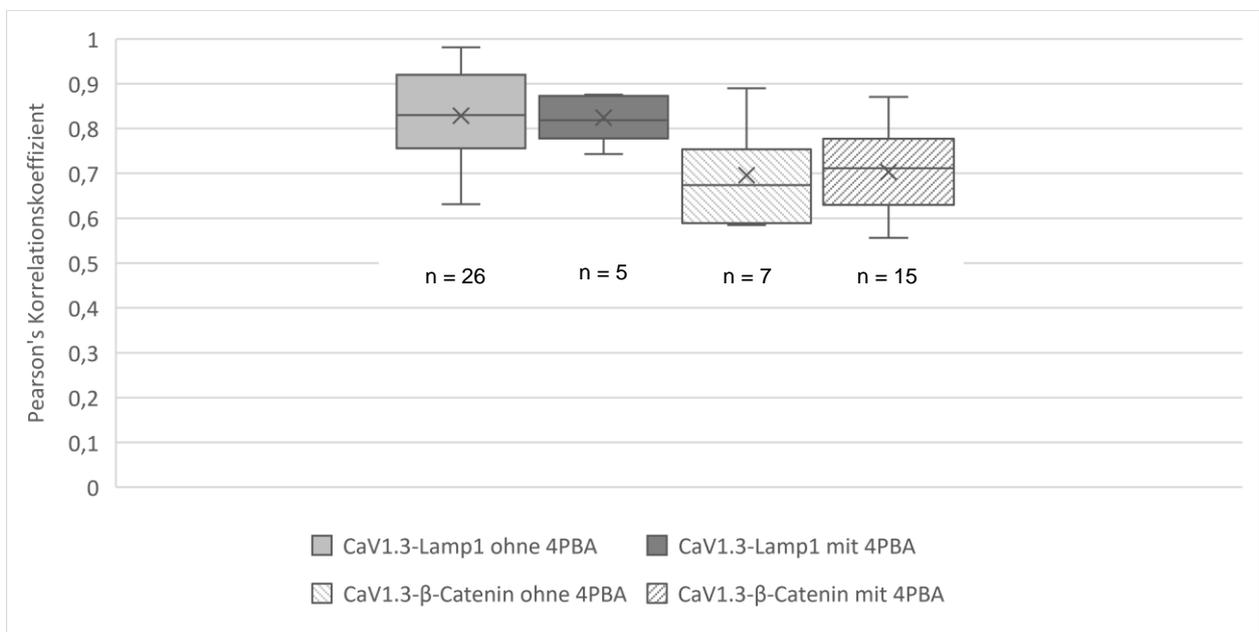


Abbildung 21: L-Typ-Calciumkanal Ca_v1.3 in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A). Immunzytochemie und Berechnung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen dem L-Typ-Calciumkanal Ca_v1.3 und dem Lysosomenmarker Lamp1 (linke Boxen) beziehungsweise zwischen Ca_v1.3 und dem Zellmembranmarker β-Catenin (rechte Boxen). Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphenybutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung. n = Anzahl Zellen.

Antikörper- kombination	Ca _v 1.3-Lamp1 ohne 4PBA	Ca _v 1.3-Lamp1 mit 4PBA	Ca _v 1.3-β-Catenin ohne 4PBA	Ca _v 1.3-β-Catenin mit 4PBA
n Samples	1	1	1	1
n Zellen	26	5	7	15
Mittelwert	0,829	0,824	0,696	0,703
SD	0,094	0,054	0,109	0,099
Median	0,83	0,819	0,674	0,712
SEM	0,019	0,024	0,041	0,026
Minimum	0,631	0,743	0,585	0,556
25. Perzentile	0,756	0,778	0,589	0,63
75. Perzentile	0,920	0,873	0,754	0,777
Maximum	0,981	0,876	0,89	0,871

Tabelle 23: L-Typ-Calciumkanal Ca_v1.3 in iPS-RPE-Patientenzellen mit endogener Bestrophin-1-Mutation (Sample A). Immunzytochemie und Berechnung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen dem L-Typ-Calciumkanal Ca_v1.3 und dem Lysosomenmarker Lamp1 (linke Spalten) beziehungsweise zwischen Ca_v1.3 und dem Zellmembranmarker β-Catenin (rechte Spalten). Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung.

Auffällig bei der Betrachtung der Färbereihe des Samples A sind die hohen Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC). Die Mittelwerte der PCC liegen zwischen 0,685 (Bestrophin-1-EEA1 ohne 4PBA) und 0,873 (Bestrophin-1-Lamp1 ohne 4PBA) und sind damit deutlich höher als die Pearson's Korrelationskoeffizienten von Sample B und ebenfalls deutlich höher als bei den Färbungen von Anoctamin-4 in HEK293-Zellen.

Der PCC-Mittelwert zwischen Bestrophin-1 und Lamp1 (0,873) war höher als der PCC-Mittelwert zwischen Bestrophin-1 und EEA1 (0,685). Die Korrelation zwischen Ca_v1.3 und Lamp1 (PCC-Mittelwert von 0,829) war höher als die Korrelation zwischen Ca_v1.3 und β-Catenin (PCC-Mittelwert von 0,696).

Die Applikation von 4PBA erbrachte fast identische PCC-Mittelwerte. Nur bei der Färbung mit Antikörpern gegen Bestrophin-1 und gegen Lamp1 führte die Inkubation mit 4PBA zu einer Reduktion des PCC-Mittelwertes von 0,87 auf 0,8.

8.2.2.2. Sample B – quantitative Beurteilung der Immunzytochemie

Der Mittelwert der Pearson's Korrelationskoeffizienten erreichte bei der Färbereihe des Samples A jeweils deutlich höhere Werte als bei der Färbereihe des Samples B – bei allen Mutationen und bei allen Antikörperkombinationen.

8.2.2.2.1. Antikörperkombination Anti-Bestrophin-1 und Anti-Lamp1 (quantitative Auswertung Sample B)

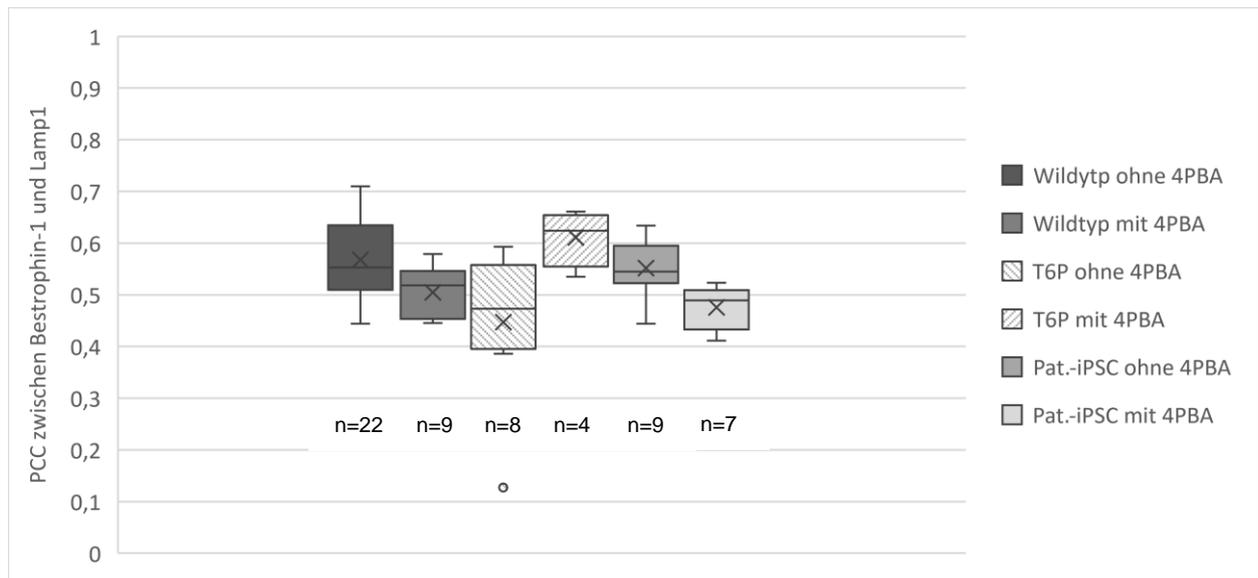


Abbildung 22: Bestrophin-1 in Lysosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B): Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (linke Boxen) oder der Mutation T6P (mittlere Boxen) beziehungsweise an Patienten-iPS-RPE-Zellen (Pat.-iPSC) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (rechte Boxen). Betrachtung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Bestrophin-1 und dem Lysosomenmarker Lamp1. Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung. n = Anzahl der Zellen

Name	Wildtyp ohne 4PBA	Wildtyp mit 4PBA	T6P ohne 4PBA	T6P mit 4PBA	Pat.-iPSC ohne 4PBA	Pat.-iPSC mit 4PBA
n Zellen	22	9	8	4	9	7
Mittelwert	0,568	0,505	0,447	0,611	0,552	0,476
SD	0,075	0,049	0,147	0,054	0,055	0,042
Median	0,553	0,518	0,473	0,624	0,545	0,489
SEM	0,016	0,017	0,052	0,027	0,0183	0,016
Minimum	0,444	0,445	0,127	0,535	0,444	0,411
25. Perzentil	0,51	0,454	0,395	0,555	0,523	0,433
75. Perzentil	0,635	0,546	0,558	0,655	0,595	0,509
Maximum	0,71	0,579	0,593	0,661	0,634	0,523

Tabelle 24: Bestrophin-1 in Lysosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B): Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (linke Spalten) oder der Mutation T6P (mittlere Spalten) beziehungsweise an Patienten-iPS-RPE-Zellen (Pat.-iPSC) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (rechte Spalten). Betrachtung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Bestrophin-1 und dem Lysosomenmarker Lamp1. Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung.

Der Mittelwert des Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Bestrophin-1 und Lamp1 bei den Patientenzellen (mit endogener Mutation) lag bei Sample B mit 0,552 deutlich unterhalb des PCC-Mittelwerts des Samples A mit 0,873.

Für die mit Wildtyp-Bestrophin-1 transfizierten iPSC-RPE wurde in Sample B ein ähnlicher PCC-Mittelwert (zwischen Bestrophin-1 und Lamp1) errechnet (0,568) wie für die Patientenzellen des Samples B (0,552). Dagegen ergab sich ein geringerer PCC-Mittelwert (zwischen Bestrophin-1 und Lamp1) für die Mutante T6P mit 0,447. Dies würde bedeuten, dass Wildtyp-Bestrophin-1 und die endogene Bestrophin-1-Mutante zu einem höheren Anteil in den Lysosomen vorliegen als die Mutante T6P.

Die Applikation von 4PBA erbrachte unterschiedliche Ergebnisse – beim Wildtyp und bei den Patientenzellen reduzierte sich der PCC-Mittelwert, bei T6P erhöhte sich der PCC-Mittelwert nach 4PBA-Applikation.

8.2.2.2.2. Antikörperkombination Anti-Bestrophin-1 und Anti-EEA1 (quantitative Auswertung Sample B)

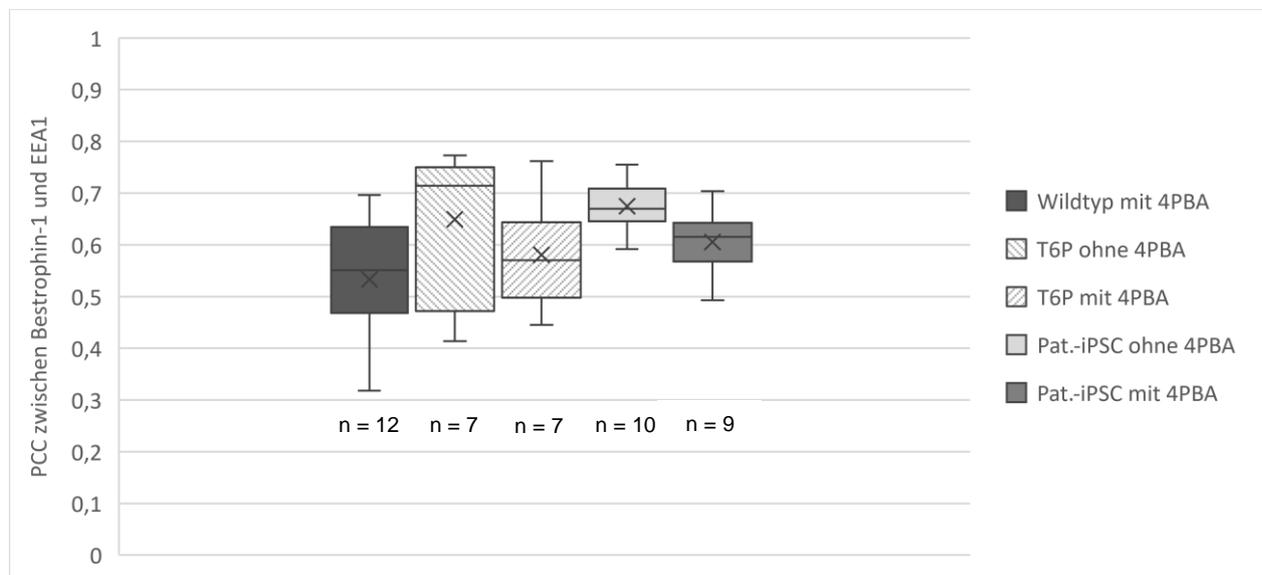


Abbildung 23: Bestrophin-1 in frühen Endosomen in iPSC-RPE-Zellen (Sample B). Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (linke Box) oder der Mutation T6P (mittlere Boxen) beziehungsweise an Patienten-iPSC-RPE-Zellen (Pat.-iPSC) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (rechte Boxen). Betrachtung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Bestrophin-1 und EEA1 als Marker für frühe Endosomen. Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPSC-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung. Die Immunzytochemie vom Wildtyp ohne 4PBA war nicht erfolgreich. n = Anzahl der Zellen.

Name	Wildtyp mit 4PBA	T6P ohne 4PBA	T6P mit 4PBA	Pat.-iPSC ohne 4PBA	Pat.-iPSC mit 4PBA
n Zellen	12	7	7	10	9
Mittelwert	0,533	0,649	0,581	0,674	0,605
SD	0,115	0,144	0,105	0,048	0,060
Median	0,551	0,714	0,57	0,67	0,615
SEM	0,033	0,055	0,040	0,015	0,020
Minimum	0,318	0,414	0,445	0,592	0,493
25. Perzentil	0,468	0,472	0,498	0,646	0,568
75. Perzentil	0,634	0,75	0,644	0,709	0,643
Maximum	0,696	0,773	0,762	0,755	0,704

Tabelle 25: Bestrophin-1 in frühen Endosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B). Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (linke Spalte) oder der Mutation T6P (mittlere Spalten) beziehungsweise an Patienten-iPS-RPE-Zellen (Pat.-iPSC) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (rechte Spalten). Betrachtung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Bestrophin-1 und EEA1 als Marker für frühe Endosomen. Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung. Die Immunzytochemie vom Wildtyp ohne 4PBA war nicht erfolgreich.

Bei der Verwendung der Antikörperkombination Anti-Bestrophin-1 und Anti-EEA1 waren auf dem Filter des Wildtyps ohne 4PBA-Applikation überhaupt keine GFP-positiven Zellen auffindbar. Für die Färbung des Wildtyps mit 4PBA-Inkubation zeigte sich mit 0,533 ein geringerer PCC-Mittelwert zwischen Bestrophin-1 und EEA1 im Vergleich zu den PCC-Mittelwerten der Mutante T6P und der Patientenzellen. Dies würde heißen, dass weniger Wildtyp-Bestrophin-1 in den frühen Endosomen vorliegt im Vergleich zu den Mutanten (T6P und endogene Mutation D302A).

Sowohl bei der Mutation T6P als auch bei den Patientenzellen führte die Inkubation mit dem Chaperon 4PBA zu einer Reduktion der PCC-Mittelwerte zwischen Bestrophin-1 und EEA1 – Bei der Mutante T6P reduzierte sich durch die 4PBA-Applikation der PCC-Mittelwert von 0,649 auf 0,581, und bei den Patientenzellen reduzierte von 0,674 auf 0,605.

8.2.2.2.3. Antikörperkombination Anti-Ca_v1.3 und Anti-Lamp1 (quantitative Auswertung Sample B)

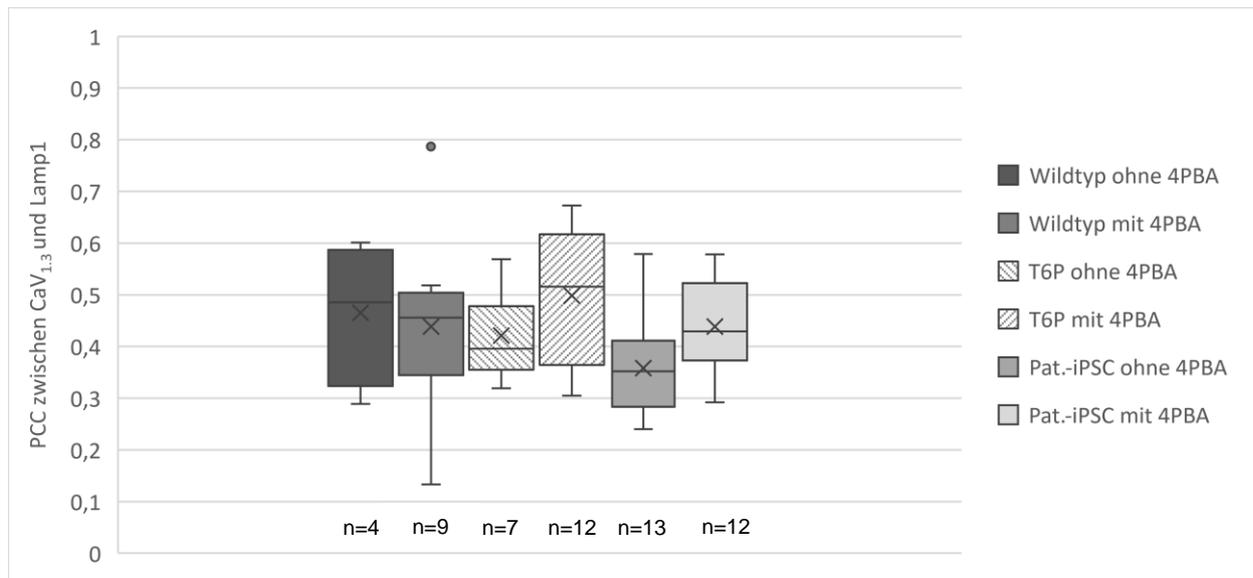


Abbildung 24: Kolokalisation von Ca_v1.3 und Lysosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B). Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (linke Boxen) oder der Mutation T6P (mittlere Boxen) beziehungsweise an iPS-RPE-Zellen von Patienten (Pat.-iPSC) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (rechte Boxen). Betrachtung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen dem L-Typ-Calciumkanal Ca_v1.3 und Lamp1 als Marker für Lysosomen. Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPS-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung. n = Anzahl der Zellen.

Name	Wildtyp ohne 4PBA	Wildtyp mit 4PBA	T6P ohne 4PBA	T6P mit 4PBA	Pat.-iPSC ohne 4PBA	Pat.-iPSC mit 4PBA
n Zellen	4	9	7	12	13	12
MW	0,465	0,438	0,421	0,499	0,358	0,438
SD	0,138	0,176	0,085	0,126	0,091	0,090
Median	0,486	0,456	0,396	0,516	0,352	0,429
SEM	0,069	0,059	0,032	0,036	0,025	0,026
Minimum	0,289	0,133	0,319	0,305	0,24	0,292
25. Perzentil	0,324	0,345	0,355	0,365	0,284	0,373
75. Perzentil	0,587	0,504	0,478	0,617	0,412	0,523
Maximum	0,601	0,787	0,569	0,673	0,579	0,578

Tabelle 26: Kolokalisation von Ca_v1.3 und Lysosomen in iPS-RPE-Zellen (Sample B). Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (linke Spalten) oder der Mutation T6P (mittlere Spalten) beziehungsweise an Patienten-iPS-RPE-Zellen (Pat.-iPSC) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (rechte Spalten). Betrachtung der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen dem L-Typ-Calciumkanal Ca_v1.3 und Lamp1 als Lysosomenmarker. Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPSC-RPE, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung.

Bei allen drei Bestrophin-1-Varianten (Wildtyp, T6P und Patientenzellen) zeigten die Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen $Ca_v1.3$ und Lamp1 deutlich geringere Werte als die Korrelationskoeffizienten zwischen Bestrophin-1 und Lamp1. Die PCC-Mittelwerte zwischen $Ca_v1.3$ und Lamp1 lagen bei 0,465 (Wildtyp), 0,421 (T6P) und 0,358 (Patientenzellen). Dies würde bedeuten, dass $Ca_v1.3$ eine geringere Assoziation zu den Lysosomen aufweist als Bestrophin-1 und dass in den mutationstragenden Zellen (T6P und endogene Mutation) $Ca_v1.3$ zu einem geringeren Anteil in den Lysosomen vorliegt als in den Zellen mit Bestrophin-1-Wildtyp.

Die Applikation von 4PBA führte bei der Antikörperkombination Anti- $Ca_v1.3$ und Anti-Lamp1 teilweise zu einer Reduktion und teilweise zu einer Erhöhung der PCC-Mittelwerte. So bewirkte 4PBA bei Wildtyp-Bestrophin-1 eine Reduktion des PCC-Mittelwertes zwischen $Ca_v1.3$ und Lamp1 und bei den mutationstragenden iPSC-RPE (T6P und Patientenzellen) eine Erhöhung des PCC-Mittelwertes.

8.2.2.2.4. Antikörperkombination Anti- $Ca_v1.3$ und Anti- β -Catenin (quantitative Auswertung Sample B)

Für die Färbungen des Samples B mit dem Anti- β -Catenin-Antikörper wurden nicht die Pearson's Korrelationskoeffizienten berechnet. Stattdessen wurde Quotienten gebildet zwischen den β -Catenin-Pixel der gesamten Zelle im Verhältnis zu den β -Catenin-Pixeln intrazellulär. Gleiches geschah für $Ca_v1.3$ (Pixel gesamte Zelle / Pixel intrazellulär).

Name	Wildtyp ohne 4PBA	Wildtyp mit 4PBA	T6P ohne 4PBA	T6P mit 4PBA	Pat.-iPSC ohne 4PBA	Pat.-iPSC mit 4PBA
β-Catenin	Nicht				Nicht	
Mittelwert	erfolgreich	6,002	2,512	2,389	erfolgreich	1,854
Median		2,514	1,807	2,090		1,783
n Zellen		10	8	10		10
$Ca_v1.3$						
Mittelwert		1,709	1,461	1,819		1,530
Median		1,603	1,415	1,879		1,535
n Zellen		10	8	10		10

Tabelle 27: Lokalisation von $Ca_v1.3$ und β -Catenin in iPSC-RPE-Zellen (Sample B). Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen nach Transfektion von Bestrophin-1-Wildtyp (linke Spalte) oder der Mutation T6P (mittlere Spalten) beziehungsweise an Patienten-iPSC-RPE-Zellen (Pat.-iPSC) mit endogener Bestrophin-1-Mutation (rechte Spalte). Betrachtung der Pixelquotienten (zwischen den Pixeln der gesamten Zelle zu den Pixeln intrazellulär) bei β -Catenin als Zellmembranmarker und bei dem L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.3$. Es erfolgte jeweils eine Färbung an iPSC-RPE-Zellen, die mit dem Chaperon Natriumphénylbutyrat (mit 4PBA) behandelt wurden und eine Färbung an iPSC-RPE ohne 4PBA-Behandlung. Die Färbungen der iPSC-RPE mit transfiziertem Wildtyp und die iPSC-RPE mit endogener Mutation ohne Inkubation mit 4PBA waren jeweils nicht erfolgreich gewesen.

Die Quotienten von Ca_v1.3 lagen für die einzelnen Färbungen zwischen 1,4 und 1,9. Ein Quotient von 1 bedeutet, dass im Zellrandbereich genauso viele Pixel vorzufinden sind wie im Zellinneren. Ein Quotient von 2 zeigt an, dass im Zellrandbereich doppelt so viele Pixel lokalisiert sind wie im Zellinneren. Es scheint somit, dass Ca_v1.3 in den gefärbten Zellen sowohl im Zellinneren vorliegt als auch zu einem etwas höheren Anteil im Zellrandbereich, also im Bereich der Zellmembran. β -Catenin soll einen Zellmembranmarker darstellen. Idealerweise wären sehr hohe Quotienten zu erwarten. Die Quotienten von β -Catenin lagen jeweils oberhalb der jeweiligen Quotienten von Ca_v1.3. Bei T6P und Patientenzellen lagen die Mittelwerte der β -Catenin-Quotienten zwischen 1,85 und 2,5. Dies bedeutet, dass auch viele Pixel von β -Catenin intrazellulär zu finden waren. Die große Diskrepanz beim β -Catenin-Quotient des Wildtyps zwischen dem Quotienten-Mittelwert von 6,002 und dem Quotienten-Median von 2,5 ist ein Zeichen für eine große Varianz zwischen den einzelnen Quotienten.

Aussagen zum unterschiedlichen Verhalten nach 4PBA-Applikation lassen sich aufgrund der lückenhaften Daten nicht treffen – beim Wildtyp und bei den Patientenzellen waren jeweils die Färbungen ohne 4PBA nicht erfolgreich gewesen.

9. Diskussion

9.1. Diskussion der Ergebnisse zu Anoctamin-4

9.1.1. Expression von Anoctamin-4 in der Zellmembran

9.1.1.1. *Expression von Wildtyp-Anoctamin-4 in der Zellmembran*

Nach den immunzytochemischen Färbungen wurde für Anoctamin-4-Wildtyp ein Mittelwert des Pearson's Korrelationskoeffizienten (PCC) zwischen Anoctamin-4 und dem Zellmembranmarker Pan-Cadherin von 0,557 berechnet. Somit scheint der größte Anteil (56%) des Anoctamin-4 in der Zellemembran exprimiert zu sein, aber auch ein großer Anteil im Zytosol vorzuliegen. Mit 9 unabhängig voneinander durchgeführten Färbungen (9 Samples) und einer Anzahl von insgesamt 312 betrachteten HEK293-Zellen liegt den Ergebnissen eine große Probengröße zugrunde, was der 56% Zellmembranexpression mehr Validität verleiht. Die Ergebnisse decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen. Denn für Anoctamin-4-Wildtyp wird sowohl eine Oberflächenexpression beschrieben (Reichhart et al., 2019; Tian, Schreiber und Kunzelmann, 2012), als auch eine intrazelluläre Lokalisation (Duran et al., 2012; Cabrita et al., 2017; Maniero et al., 2019). Die Ergebnisse zum Expressionsort passen auch zu den beschriebenen Funktionen von Anoctamin-4 als calciumabhängiger Kationenkanal (Reichhart et

al., 2021; Reichhart et al., 2019; Yang et al., eingereicht) und als Regulator von intrazellulären Calciumspeichern (Cabrita et al., 2017).

9.1.1.2. *Einfluss der Anoctamin-4-Mutationen auf die Zellmembranexpression der Anoctamin-4-Proteine*

Die mithilfe der zielgerichteten Mutagenese hergestellten Anoctamin-4-Mutationen führten alle zu einer geringeren Expression in der Zellmembran im Vergleich zum Wildtyp, erkenntlich an geringeren Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin. Der Unterschied war statistisch signifikant für die meisten Mutationen. Lediglich bei den Mutanten g1582a und t2147c waren bei einem Teil der Färbungen (bei denen das Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen 24 Stunden betrug) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen. Bei dem anderen Teil der Färbungen, bei denen das Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung auf 12 Stunden verkürzt wurde, wurden für die Mutanten g1582a und t2147c signifikant geringere PCC-Mittelwerte zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin berechnet. Jedoch war der Unterschied in der Zellmembranexpression zwischen dem Wildtyp und den sieben untersuchten Anoctamin-4-Mutanten recht gering ausgeprägt – alle Mutanten zeigten eine verminderte Oberflächenexpression, die auf 95% bis 80% der Oberflächenexpression vom Wildtyp reduziert war. Die verminderte Expression der Anoctamin-4-Mutanten kann am ehesten auf einen gestörten Proteintransport (Trafficking-Defekt) zurückgeführt werden.

Im selben Labor durchgeführte Funktionsuntersuchungen mit Patch Clamp Experimenten an mit Anoctamin-4 transfizierten HEK293-Zellen zeigten stärker ausgeprägte Unterschiede zwischen Anoctamin-4-Wildtyp und den beschriebenen Mutationen (Yang et al., eingereicht). In den Patch Clamp Experimenten zeigten sich calciumabhängige Kationenströme, die bei den Mutanten sehr stark (auf unter 40% der Ionenströme des Wildtyps) reduziert waren. Einige Mutationen (c1674g, a1684t und t1688a) resultierten in einem vollständigen Verlust der Anoctamin-4-Kationenkanalfunktion in den Patch Clamp Untersuchungen (Yang et al., eingereicht).

Beim Vergleich der geringen Reduktion der Zellmembranexpression mit den starken Funktionseinbußen der Mutanten, lässt sich schlussfolgern, dass der mutationsbedingte verminderte Transport in die Zellmembran nur einen Teil der mutationsbedingten Pathophysiologie erklären kann – die untersuchten Mutationen scheinen vor allem die Funktion von Anoctamin-4 als Kationenkanal zu beeinträchtigen (Yang et al., eingereicht)

Strukturmodellanalysen zeigten, dass für alle untersuchten Mutationen eine geringere Stabilität des gefalteten Anoctamin-4-Proteins vorhergesagt wird. Viele der Mutationen führten zu einem Aminosäureaustausch, der in einer Änderung der Ladung oder der Einfügung einer großen

Seitenkette innerhalb des Moleküls resultierte. Für vier Mutationen (c1674g, a1684t, t1688a und a1807g) wurde anhand der Strukturmodellanalysen eine Lokalisation in der Nähe der Calciumbindungsstelle vorhergesagt, sodass wahrscheinlich auch die Calciumbindung und dementsprechend die Kationenkanalfunktion beeinträchtigt ist (Yang et al., eingereicht). Die Lokalisation der Mutationen in der Nähe der Calciumbindungsstelle kann eine Erklärung sein für die Diskrepanz der Ausprägung der Unterschiede zwischen Zellmembranexpression und Kationenkanalfunktion beim Vergleich des Wildtyps mit den Mutanten (Yang et al., eingereicht).

9.1.2. Expression von Anoctamin-4 in anderen Zellorganellen

Bei den Färbungen unter Verwendung von Antikörpern gegen Anoctamin-4 und gegen EEA1 (early endosome antigen 1, frühe Endosomen) ergab sich ein Mittelwert der Pearson's Korrelationskoeffizienten von 0,742 für Anoctamin-4-Wildtyp. Somit scheint ein großer Anteil von Anocatmin-4-Wildtyp in den frühen Endosomen lokalisiert zu sein – etwa 74,2%. Für alle Mutanten wurde ein signifikant geringerer PCC-Mittelwert berechnet (0,62 bis 0,7). Diese Ergebnisse lassen folgende Überlegungen und Hypothesen zu:

- 1) Anoctamin-4 könnte eine Funktion in den frühen Endosomen besitzen,
- 2) die hohen PCC könnten durch eine hohe Turnoverrate bedingt sein,
- 3) die Mutationen führen zu keiner Akkumulation der Anoctamin-4-Proteine in den frühen Endosomen.

Auf diese Überlegungen soll im Folgenden eingegangen werden.

1) Könnte Anoctamin-4 eine Funktion in Frühen Endosomen haben?

Nach den Experimenten scheint Anoctamin-4-Wildtyp zu einem höheren Anteil in den frühen Endosomen exprimiert zu sein (PCC-Mittelwert von 0,742) als in der Zellmembran (PCC-Mittelwert von 0,557). Alle Mutationen führen zu einer geringeren Expression in den frühen Endosomen und in der Zellmembran. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Anoctamin-4 eine Funktion in der Zellmembran und in den frühen Endosomen besitzt und die Mutationen zu einem gestörten Transport in beide Kompartimente führen. Für die Expression in der Zellmembran als calciumabhängiger Kationenkanal liegen bereits umfangreiche Ergebnisse vor (Reichhart et al., 2021; Reichhart et al., 2019; Yang et al., eingereicht). Weiterhin liegen Experimente vor, in denen Anoctamin-4 in Zellorganellen beschrieben wird – Anoctamin-4 scheint auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) exprimiert zu sein und dort als Regulator des Calciumspeichers zu fungieren (Cabrita et al., 2017). Nach den vorliegenden Ergebnissen wären zukünftige Experimente zu einer möglichen Funktion von Anoctamin-4 in den frühen Endosomen interessant, und die Ergebnisse könnten die weitere Charakterisierung von Anoctamin-4 unterstützen.

2) Könnte der hohe Pearson's Korrelationskoeffizient durch eine hohe Turnoverrate bedingt sein?

Das Turnover ist zur Feinregulation der Ionenkanalexpression in der Zellmembran bedeutend (Estadella et al., 2020). Der hohe PCC-Mittelwert zwischen EEA1 und Anoctamin-4 könnte durch eine hohe Turnoverrate erklärt werden. Während für Bestrophin-1-Mutanten hohe Turnoverraten beschrieben wurden (Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020), liegen bisher noch keine Erkenntnisse zum Ausmaß des Turnovers von Anoctamin-4-Kanälen vor. Es wäre interessant zu untersuchen, inwieweit eine hohe Turnoverrate eine Rolle spielt in der Regulation der Oberflächenexpression von Anoctamin-4.

Der hohe PCC-Mittelwert zwischen EEA1 und Anoctamin-4-Wildtyp (0,742) könnte auch durch eine hohe Turnoverrate aufgrund der exogenen Überexpression bedingt sein. Endogene Anoctamine werden in geringeren Mengen exprimiert als im Überexpressionssystem mit exogen transfizierter DNA (Tian, Schreiber und Kunzelmann, 2012). Auf die großen Mengen transfizierter DNA (und eventuell erhöhten Oberflächenexpression im Vergleich zu in vivo) könnten die HEK-Zellen möglicherweise mit einer höheren Rate an Endozytose reagieren. Es gibt verschiedenste Studien, die zeigen, dass in heterologen Überexpressionssystemen die Proteinsortierung und der Proteintransport verändert sein können, wodurch die Proteine an unüblichen Orten exprimiert werden im Vergleich zur endogenen Expression der Proteine (Marmorstein, Csaky, Baffi et al., 2000a; Lisenbee, Karnik und Trelease, 2003; Johnson et al., 2013; Johnson et al., 2017). Beispielsweise werden die Chloridkanäle-3/-4/-5 (ClC-3/-4/-5) in vivo in den Membranen des endolysosomalen Systems exprimiert, in denen sie als $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Austauscher fungieren und dadurch die Ansäuerung der Endo-/Lysosomen durch die Vakuoläre H^+ -ATPase ermöglichen (Jentsch und Pusch, 2018). In heterologen Überexpressionssystemen werden die Chloridkanäle-3/-4/-5 jedoch auch teilweise in der Zellmembran exprimiert (Okkenhaug, Weylandt, Carmena et al., 2006; Jentsch und Pusch, 2018; Friedrich, Breiderhoff und Jentsch, 1999). Die partielle Zellmembranexpression der Chloridkanäle-3/-4/-5 in heterologen Überexpressionssystemen macht die Chloridkanäle für funktionelle Untersuchungen besser zugänglich (Jentsch und Pusch, 2018). Für Forschungen zur Lokalisation von Ionenkanälen, wie in den hier durchgeführten Experimenten zu Anoctamin-4, wäre ein durch ein heterologes Überexpressionssystem bedingter veränderter Expressionsort jedoch nachteilig. Aus diesem Grund sollten die gewonnenen Erkenntnisse zur Anoctamin-4-Expression in HEK293-Zellen durch immunzytochemische Versuche an anderen Zellen ergänzt werden.

3) Führen Anoctamin-4-Mutationen zu einer Akkumulation von Anoctamin-4 im endolysosomalen System?

Anoctamin-4-Mutationen scheinen zu keiner Akkumulation der Mutanten im endolysosomalen System zu führen. Denn sie führen zu einer geringeren Expression der Mutanten in den frühen Endosomen im Vergleich zum Wildtyp-Anoctamin-4 (Yang

et al., eingereicht). Zudem zeigen die untersuchten Mutationen bei den Lamp1-Färbungen keine Unterschiede zum Wildtyp. Bei einer „Verstopfung“ des endolysosomalen Systems wären höhere Anoctamin-4-Mengen in den frühen Endosomen und/oder in den Lysosomen zu erwarten beim Vergleich der Mutationen mit dem Wildtyp. Die geringeren PCC zwischen EEA1 und Anoctamin-4 bei den Mutationen im Vergleich zum Wildtyp könnten durch einen geringeren Transport der mutanten Proteine innerhalb der Zelle erklärt werden (Yang et al., eingereicht). Ein mutationsbedingter geringerer Transport der Anoctamin-4-Proteine zur Zellmembran und dadurch eine geringere Endozytose könnte auch die vorliegenden Ergebnisse erklären.

9.1.3. Führen Anoctamin-4-Mutationen zu einer erhöhten Apoptoserate?

Es konnte keine erfolgreiche Färbung unter Verwendung des anti-cleaved Caspase 3-Antikörpers entwickelt werden. Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von 1 mmol/l und Cobalt-II-Chlorid in einer Konzentration von 600 μ M stellten jeweils ein zu starkes Zellgift dar, denn sie führten zu einem Absterben der meisten Zellen, die dann während der Färbeschritte nicht weiter auf den Coverslips haften blieben. Cobalt-II-Chlorid in einer Konzentration von 300 μ M führte zu sichtbaren Veränderungen (weniger Zellen und mit heterogenen Zellkernen), aber es blieben genug Zellen während des Färbens auf den Coverslips erhalten. Da sich die Negativkontrollen (ohne den primären Antikörper), die Positivkontrollen (normale Färbung und Applikation von Cobalt-II-Chlorid zur Erzeugung von Zellstress) und die normalen Färbungen alle ähnlich darstellten hinsichtlich des AF546-Signals (sekundärer Antikörper für Anti-cleaved Caspase 3), muss das AF546-Signal jedoch auf eine Bindung des primären und/oder sekundären Antikörpers an unspezifische zytosolische Bindungsstellen zurückgeführt werden. So können aus diesen Experimenten keine Aussagen zu einer möglichen erhöhten Apoptoserate von mit Anoctamin-4-Mutationen transfizierten HEK-Zellen getroffen werden.

Jedoch konnte mittels FACS-Untersuchungen (Fluorescence-Activated Cell Sorting) im selben Labor erfolgreich die Apoptoserate an mit Anoctamin-4-Mutationen transfizierten HEK-Zellen untersucht werden (Yang et al., eingereicht). Mit FACS kann fluoreszenzmarkiertes Annexin 5 erfasst werden. Annexin 5 ist ein calciumbindendes Protein, das an extrazelluläres Phosphatidylserin bindet (Yang et al., eingereicht). Eine Phosphatidylserin-Externalisierung findet unter anderem während der Apoptose statt und dient als Signal für die Phagozytose apoptotischer Zellen (Maxfield und Menon, 2016; Yang et al., eingereicht). Mittels FACS-Untersuchungen konnte über die Bestimmung des Anteils Annexin 5 positiver Zellen eine erhöhte Apoptoserate für einige der untersuchten Anoctamin-4-Mutationen nachgewiesen werden – für g1582a, a1684t und t1688a. Für die restlichen Mutationen konnten keine signifikanten Unterschiede im Anteil Annexin 5 positiver HEK-Zellen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Yang et al., eingereicht).

Somit könnte die erhöhte Apoptoserate für einige der untersuchten Mutationen eine mögliche Ursache in der Pathophysiologie von Anoctamin-4-assoziierten Erkrankungen darstellen. Eine verbleibende Frage wäre jedoch, warum nicht alle Anoctamin-4-Mutationen zu einer erhöhten Apoptoserate führen.

Ebenfalls mittels FACS-Untersuchung konnte eine schwache calciumaktivierte Scramblasenaktivität von Anoctamin-4-Wildtyp bei erhöhten intrazellulären Calciumkonzentrationen nachgewiesen werden. Bei einigen Mutationen (c387g, c1674g, a1684t, a1807g) war die Scramblasenaktivität signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp, für die restlichen Mutationen zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede (Yang et al., eingereicht). Inwieweit eine verminderte Scramblasenaktivität in der Pathophysiologie von Anoctamin-4-Mutationen eine Rolle spielt, bleibt noch ungewiss.

9.1.4. Durch Anoctamin-4-Mutationen verursachte Epilepsien

Die hier untersuchten Anoctamin-4-Mutationen wurden erstmals als Ursache für verschiedene Epilepsieformen identifiziert (Yang et al., eingereicht). Bei diesen ausgewählten Epilepsiefällen wurden verschiedene Punktmutationen im Anoctamin-4-Gen (c387g, g1582a, c1674g, a1684t, t1688a, a1807g, t2174c) als ursächlich identifiziert. Diese Mutationen wurden mit zielgerichteter Mutagenese hergestellt (Kapitel 7.1) und immunzytochemisch untersucht (Kapitel 8.1), um Erkenntnisse zur Pathophysiologie der durch Anoctamin-4-Mutationen bedingten Epilepsien zu gewinnen. Zudem wurden durch Yang elektrophysiologische Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Anoctamin-4-Mutanten durchgeführt (Yang et al., eingereicht).

Zu diesen mutationsassoziierten Epilepsien gehören unter anderem die Entwicklungsbedingte und Epileptische Enzephalopathie (DEE, developmental and epileptic encephalopathy), die für die Patienten der Mutationen c1674g, a1684t und t1688a beschrieben wurde (Yang et al., eingereicht). Bei der DEE sind die kognitiven Einschränkungen sowohl durch die entwicklungsbedingten neurologischen Einschränkungen als auch durch die epileptische Aktivität (die epileptischen Anfälle und die interikterische epileptische Aktivität) bedingt. Die entwicklungsbedingten neurologischen Veränderungen sind die Ursache für die Epilepsie. Meistens liegen der DEE ätiologisch genetische Abnormalitäten zugrunde (Raga, Specchio, Rheims und Wilmshurst, 2021; Happ und Carvill, 2020). Neben Anoctamin-4 (Yang et al., eingereicht) sind Mutationen in vielen anderen Genen als ursächlich für DEE beschrieben (Happ und Carvill, 2020). Die Mutationen c387g und a1807g verursachen bei den zugehörigen Patienten eine Epileptische Enzephalopathie (EE, epileptic encephalopathy) (Yang et al., eingereicht). Bei der EE verursachen die epileptische Aktivität und/oder die wiederkehrenden epileptischen Anfälle eine progressive kognitive Einschränkung. Die Kognition kann vor Manifestation der Epilepsie

normal oder fast normal gewesen sein (Raga et al., 2021). Eine Unterscheidung zwischen EE und DEE ist therapeutisch bedeutend. Erkrankte mit EE bedürfen einer aggressiven antiepileptischen Therapie, da eine optimale Therapie die kognitiven Einschränkungen deutlich verbessern kann (Raga et al., 2021). Bei den DEE sollte die antiepileptische Therapie auf eine Verbesserung der Epilepsie abzielen, da dies die kognitiven Einschränkungen und die Lebensqualität verbessern kann. Man sollte aber auch realistische Erwartungen an die antiepileptische Therapie haben und eine Übermedikation aufgrund der unerwünschten Medikamentenwirkungen vermeiden. Denn oft ist die DEE durch therapierefraktäre epileptische Anfälle charakterisiert und selbst bei guter Kontrolle der epileptischen Anfälle hat die kognitive Entwicklung oft eine schlechte Prognose (Happ und Carvill, 2020; Raga et al., 2021).

Die Mutation g1582a liegt bei einer Familie vor, in der 22 Personen von einer Generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus betroffen sind (GEFS+, genetic epilepsy with febrile seizures plus) (Yang et al., eingereicht). GEFS+ wird autosomal-dominant und mit unvollständiger Penetranz (80%) vererbt. Sie ist charakterisiert durch das Auftreten von Fieberkrämpfen außerhalb des normalen Zeitrahmens (6 Monate bis 6 Jahre) und afebrilen epileptischen Anfällen (Scheffer und Nabbout, 2019; Claes et al., 2004). In allen 20 der genetisch untersuchten Familienangehörigen wurde die Mutation g1582a nachgewiesen (Yang et al., eingereicht).

Die Mutation t2147c ist bisher noch nicht als epilepsieverursachende Mutation beschrieben. Die Mutation t2147c wurde aufgrund eines Zahlendrehers hergestellt, anstelle der Mutation t2174c. t2174c wurde bei einer Patientin mit Temporallappenepilepsie (TLE, temporal lobe epilepsy) entdeckt (Yang et al., eingereicht). Die Mutante t2174c zeigte bei den immunzytochemischen Färbungen keine signifikant reduzierte Oberflächenexpression und keine signifikant reduzierte Expression in den frühen Endosomen im Vergleich zum Wildtyp (Yang et al., eingereicht). Jedoch wurde auch für t2174c eine signifikante Reduktion der calciumaktivierten Ionenströme gemessen (Yang et al., eingereicht).

Bisher gibt es noch keine Erkenntnisse darüber, wie die untersuchten Mutationen die oben beschriebenen Epilepsieformen pathophysiologisch bedingen könnten (Yang et al., eingereicht). Die verminderte Expression in der Zellmembran und die verminderte Expression in den frühen Endosomen der Anoctamin-4-Mutationen könnten möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie spielen, genauso wie die von Yang beschriebenen Effekte – die instabile Proteinstruktur, die teilweise Lokalisation der Mutationen in der Nähe der Calciumbindungsstelle, die Reduktion beziehungsweise der vollständige Verlust der Kationenkanalfunktion, die teilweise verminderte Scramblasenaktivität sowie die teilweise erhöhte Apoptoserate der untersuchten Mutationen (Yang et al., eingereicht)

Eine eindeutige Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad (DEE und EE stellen die schwereren Epilepsieerkrankungen dar als die GEFS+ und die TLE) und den beobachteten mutationsbedingten Effekten im Labor ist nur teilweise möglich.

In der Gruppe der DEE/EE-Patienten finden sich die Mutationen mit der stärksten Reduktion der Zellmembranexpression und der Kationenkanalfunktion (c387g, c1674g, a1684t, t1688a und a1807g). Dem klinisch milderen Phänotyp der GEFS+ liegt die Mutation g1582a zugrunde, die eine mildere Reduktion der Zellmembranexpression aufweist (keine signifikante Reduktion des PCC-Mittelwertes bei den Färbungen mit Fixierung 24 Stunden nach Transfektion, signifikante Reduktion des PCC-Mittelwertes bei den Färbungen mit Fixierung 12 Stunden nach Transfektion), und einen inkompletten Funktionsverlust des Kationenkanals. Auch dem klinisch milderen Phänotyp der TLE liegt mit der Mutation t2174c eine Mutation zugrunde, die zu einem inkompletten Funktionsverlust führt und zu keinen signifikanten Unterschieden in der Zellmembranexpression (Yang et al., eingereicht). Weiterhin sind die Mutationen g1582a und t2174c nach den Strukturmodellanalysen die einzigen Mutationen, die nicht zu einer Ladungsänderung der neuen Aminosäure oder zu einem Einbau einer großen Seitenkette führen (Yang et al., eingereicht).

Jedoch führt die Mutation a1807g zu einem schweren klinischen Phänotyp (EE) und resultierte nur in geringen Funktionseinschränkungen des Kationenkanals auf (Yang et al., eingereicht).

9.1.5. Stellt Natriumphanylbutyrat einen geeigneten Chaperon für die Anoctamin-4-Mutatanten dar?

Ziel der Applikation von Natriumphanylbutyrat (4PBA) war es, zu untersuchen, ob 4PBA einen geeigneten Chaperon für die Anoctamin-4-Mutatanten darstellt und zu einer erhöhten Expression von Anoctamin-4 in der Plasmamembran führen kann. Um von therapeutischem Interesse zu sein, sollte sich durch 4PBA zudem die Funktion von Anoctamin-4 als Kationenkanal und als Scramblase bedeutend verbessern. Mit den immunzytochemischen Experimenten kann nur der Frage nach einer Verbesserung des Proteintransports nachgegangen werden.

Nach den Ergebnissen der Immunzytochemie stellt 4PBA keinen geeigneten Chaperon für die untersuchten Anoctamin-4-Mutatanten dar. Für eine erfolgreiche Funktion von 4PBA als Chaperon hätte man eine deutliche Steigerung der Zellmembranexpression von Anoctamin-4 nach 4PBA-Inkubation sehen müssen. Es waren sowohl Steigerungen als auch Reduktionen der Oberflächenexpression durch die 4PBA-Inkubation zu verzeichnen, die meisten Änderungen waren aber statistisch nicht signifikant.

Die Reduktion der Oberflächenexpression der Mutanten war recht gering ausgeprägt – sie war auf maximal 80% der Oberflächenexpression des Wildtyps reduziert. Somit ist der Unterschied zwischen physiologisch im Zytosol vorliegendem Anoctamin-4 und dem mutationsbedingten erhöhten Anteil von Anoctamin-4 im Zytosol eher gering. Deshalb sind die Möglichkeiten des Effekts von 4PBA auf eine Änderung der Oberflächenexpression begrenzt.

9.1.6. Mögliche Erklärungen für die große Schwankungsbreite der Pearson's Korrelationskoeffizienten (zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin) beim Wildtyp-Anoctamin-4 zwischen verschiedenen Samples

Bei der ersten Zwischenauswertung der Samples 1 – 4 zeigte der Mittelwert der Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin beim Wildtyp recht unterschiedliche Werte zwischen den einzelnen Samples. Als PCC-Mittelwert aller Zellen der Samples 1 – 4 wurde 0,564 errechnet. Der höchste PCC-Mittelwert unter den vier verschiedenen Samples lag bei 0,657 (Sample 1), der geringste PCC-Mittelwert lag bei 0,572 (Sample 4).

Eine Überlegung zur Ursache der großen Schwankungen des PCC ist, dass das Überexpressionssystem (durch die Transfektion großer Mengen exogener DNA) zu einem starken Zellstress führt. Die einzelnen Zellen oder auch die einzelnen Passagen könnten etwas unterschiedlich empfindlich auf diesen Zellstress reagieren, was dann zu inhomogeneren Werten zwischen den betrachteten Zellen führen könnte.

Um den Zellstress durch das Überexpressionssystem zu verringern, wurde das Immunzytochemie-Protokoll für Färbungen mit Wildtyp-Anoctamin-4 variiert - zum einen wurde die Menge an transfizierter DNA variiert und zum anderen wurde das Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung verkürzt. Die Transfektion unterschiedlicher Mengen an Wildtyp-DNA (200ng, 100ng, 50ng) erbrachte keine signifikanten Unterschiede in den PCC-Mittelwerten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin beim Vergleich der einzelnen Gruppen mit verschiedenen Mengen an transfizierter DNA. Die Expression von Anoctamin-4 in der Zellmembran scheint damit nicht abhängig zu sein, ob 200ng, 100ng oder 50ng DNA transfiziert wird. Die Transfektionseffizienz war bei allen verwendeten DNA-Mengen sehr hoch, abgeschätzt wurde sie qualitativ während des Mikroskopierens (etwa 80%). Es scheint also eine ausreichende Menge an DNA zur Transfektion gewählt worden zu sein.

Eine verkürzte Zeitspanne zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (12 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden) führte zu signifikant höheren Pearson's Korrelationskoeffizienten zwischen Anoctamin-4 und Pan-Cadherin, also einer größeren Zellmembranexpression von Anoctamin-4-Wildtyp. Die verkürzte Exposition der Zellen

gegenüber dem Zellstress durch das Überexpressionssystem könnte eine Erklärung für die höhere Zellmembranexpression sein. Auch bei dem verkürzten Zeitintervall von 12 Stunden zwischen Transfektion und Fixierung der Zellen blieb die Transfektionseffizienz hoch.

Das verkürzte Zeitintervall zwischen Transfektion und Fixierung resultierte in einem größeren Unterschied der Zellmembranexpression beim Vergleich von Anoctamin-4-Wildtyp mit drei Mutanten. Denn die untersuchten Mutanten zeigten beim verkürzten Zeitintervall eine stärkere Reduktion der Zellmembranexpression (t1688a) beziehungsweise zeigten sie erst beim verkürzten Zeitintervall eine signifikante Reduktion der Zellmembranexpression (g1582a und t2147c) im Vergleich zum Wildtyp. Das stützt die Überlegung, dass eine verkürzte Exposition gegenüber dem Zellstress des Überexpressionssystems sich positiv auf die Zellmembranexpression vom Wildtyp auswirkt und dadurch Unterschiede zur Zellmembranexpression der Mutanten deutlicher werden.

9.2. Diskussion der Ergebnisse zu Bestrophin-1

Da nur zwei erfolgreiche Färbereien (Sample A und Sample B) dieser Monographie zugrunde liegen und sich diese heterogen darstellen (sowohl in der Zellmorphologie als auch in der quantitativen Auswertung) ist die Aussagekraft begrenzt.

9.2.1. Vergleich der Ergebnisse der Immunzytochemie mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zu Bestrophin-1

9.2.1.1. *Intrazelluläres Verhalten von Bestrophin-1 – Assoziation von Bestrophin-1 mit den Zellorganellmarkern Lamp1 und EEA1 in iPS-RPE-Zellen*

Viele Mutationen in für Membranproteine codierenden Genen sind mit Trafficking-Defekten assoziiert (Milenkovic et al., 2011). Bestrophin-1 wird in der Zellmembran exprimiert (Marmorstein et al., 2000b; Johnson et al., 2017; Johnson et al., 2013; Reichhart et al., 2010) und ist auch intrazellulär, im endoplasmatischen Retikulum zu finden (Neussert et al., 2010; Barro-Soria et al., 2010; Gómez, Tamm und Strauß, 2013). Die meisten untersuchten Bestrophin-1-Mutationen führen zu einer verringerten Zellmembranexpression von Bestrophin-1 (Cordes et al., 2020). Das gestörte Trafficking der Bestrophin-1-Ionenkanäle aufgrund von Mutationen im Bestrophin-1-Gen wird als eine pathophysiologische Erklärung für Morbus Best herangezogen (Reichhart et al., 2010). Daneben gibt es weitere pathophysiologische Mechanismen bei Morbus Best, wie eine geringere Proteinstabilität und Einschränkungen der Ionenkanalfunktion von Bestrophin-1, oder ein gestörter Flüssigkeitstransport und ein verminderter Abbau der Fotorezeptoraußensegmente im RPE (Marmorstein et al., 2018; Milenkovic et al., 2018; Johnson et al., 2017; Singh et al., 2015; Singh et al., 2013b).

In den hier durchgeführten immunzytochemischen Färbungen erfolgte keine Färbung von Bestrophin-1 und Zellmembranmarkern. Stattdessen wurden Antikörpern gegen Antigene der frühen Endosomen (EEA1) und gegen Antigene von Lysosomen (Lamp1) eingesetzt, um die Lokalisation von Bestrophin-1 und verschiedenen Mutanten in diesen intrazellulären Organellen zu untersuchen.

9.2.1.1.1. Assoziation von Bestrophin-1 zu den Lysosomen

Wildtyp-Bestrophin-1 lag in den hier durchgeführten Versuchen zu 57% in den Lysosomen vor (PCC-Mittelwert zwischen Wildtyp-Bestrophin-1 und Lamp1 von 0,568 in Sample B). Ein Vorliegen von Bestrophin-1 in den Lysosomen könnte durch verschiedene Ansätze erklärt werden:

- 1) Bestrophin-1 könnte zum lysosomalen Abbau vorliegen,
- 2) Bestrophin-1 könnte in den Lysosomen eine Funktion als Anionenkanal haben oder
- 3) Bestrophin-1 könnte im Rahmen des Turnovers von Ionenkanälen in Lysosomen lokalisiert sein. Auf diese drei Ansätze soll im Folgenden eingegangen werden.

1) Assoziation von Bestrophin-1 und Lamp1 aufgrund des lysosomalen Abbaus von Bestrophin-1 und/oder einer Überlastung des endolysosomalen Abbauweges:

Für autosomal-dominant-vererbte Bestrophinopathien schlägt Milenkovic die Lysosomen als Abbauort mutanter Bestrophin-1-Proteine vor (Milenkovic et al., 2020). Wenn der hohe PCC-Mittelwert zwischen Bestrophin-1 und Lamp1 beim Wildtyp-Bestrophin-1 (0,568) auf den vermehrten Abbau von Bestrophin-1-Proteinen in den Lysosomen zurückgeführt werden soll, so wäre zu erwarten, dass die beiden untersuchten Mutanten, T6P und D302A der Patientenzellen, höhere PCC-Werte als Wildtyp-Bestrophin-1 aufweisen, da sie aufgrund der Mutation vermehrt abgebaut werden. In Sample B wurde jedoch ein geringerer PCC-Mittelwert für die Mutanten (0,447 für die Mutante T6P und 0,552 für die Mutante D302A der Patientenzellen) im Vergleich zum Wildtyp errechnet. Bei den Färbungen des Samples A (alles Patientenzellen) wurden generell deutlich höhere PCC ermittelt. Der PCC zwischen Bestrophin-1 und Lamp1 betrug hier 0,873. Somit wäre es möglich, den höheren PCC der Patientenzellen des Samples A als verstärkten lysosomalen Abbau der Bestrophin-1-Proteine zu interpretieren.

Milenkovic führte Untersuchungen an MDCK-II-Zellen zu einigen Bestrophin-1-Mutanten (L21V, R92S, L224M, F305S) bezüglich ihres intrazellulären Verhaltens durch. Die vier untersuchten Mutanten zeigten dabei keine Kolo-kalisation mit Lamp1 (Milenkovic et al., 2011). So stehen die Experimente dieser Monographie im Kontrast zu den Beobachtungen von Milenkovic von 2011. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die Verwendung verschiedener Zelltypen darstellen – MDCK-II-Zellen wurden bei Milenkovic verwendet, iPS-RPE-Zellen wurden für diese

Monographie verwendet. MDCK-II-Zellen exprimieren kein endogenes Bestrophin-1, während iPSC-RPE endogenes Bestrophin-1 exprimieren und als Zellmodell den RPE-Zellen in vivo deutlich näherkommen. Es gibt einige Experimente, in denen unterschiedliche Beobachtungen bezüglich des Traffickings zwischen MDCK-II-Zellen und RPE-Zellen gemacht wurden. Deshalb empfiehlt Johnson et al, Trafficking-Experimente auch im RPE-System zu überprüfen (Johnson et al., 2017). Milenkovic konnte zudem 2018 für dieselben Mutanten, wie sie 2011 verwendet wurden, eine Assoziation zu den Lysosomen nachweisen (Milenkovic et al., 2018).

Weiterhin kann das Problem auftreten, dass Überexpressionssysteme einen Trafficking-Defekt verursachen können (Johnson et al., 2017; Marmorstein et al., 2000a; Lisenbee, Karnik und Trelease, 2003). Die Experimente dieser Monographie wurden für den Wildtyp und die Mutation T6P an einem Überexpressionssystem durchgeführt. Bei den Patientenzellen wurde kein Bestrophin-1 transfiziert. Folglich lag kein Überexpressionssystem des endogenen Wildtyp-Bestrophin-1 versus der Mutante T6P vor. Die Überexpression scheint nicht per se das Verhalten des endogenen Bestrophin-1 und Interaktionspartnern wie Cav1.3 zu beeinflussen (Cordes et al., 2020). Trotzdem wäre es möglich, die Überexpression vom Wildtyp-Bestrophin-1 oder der Mutante T6P als Ursache einer vermehrten Akkumulation in den Lysosomen anzunehmen.

Die zellulären Qualitätskontrollsysteme und die Abbausysteme können durch den übermäßigen Anfall fehlgefalteter Proteine überstrapaziert und erschöpft werden (Milenkovic et al., 2020). Am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg wurde untersucht, ob der vermehrte lysosomale Abbau von mutanten Bestrophin-1-Proteinen den lysosomalen pH-Wert verändert (Nachtigal et al., 2020; Milenkovic et al., 2020; Milenkovic et al., 2018). Dazu wurden für zwei Wochen die iPSC-RPE täglich mit Fotorezeptoraußensegmenten inkubiert. In den iPSC-RPE mit mutanten und intrazellulär lokalisierten Bestrophin-1-Proteinen (zwei der untersuchten Mutanten) wurde ein signifikanter Anstieg des pH-Werts der Lysosomen verzeichnet. Änderungen im pH-Wert von Lysosomen können lysosomale Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen. Deshalb wurde weiterhin die Spaltung von Cathepsin D untersucht, einer wichtigen Protease in den Lysosomen. Cathepsin D wird als inaktives Proenzym mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa im ER produziert. Im sauren Milieu der Endosomen und Lysosomen wird es gespalten – das aktive Enzym besteht schließlich aus einer größeren, etwa 34 kDa großen Einheit und einer kleineren, etwa 14 kDa-Einheit. Im normalen steady-state Zustand liegen nur die aktiven Formen, die 34 kDa- und die 14 kDa-Form vor, nicht jedoch das 55 kDa große Proenzym. Das Zuführen von Fotorezeptoraußensegmenten und die Applikation von Chloroquin induzieren jeweils Zellstress. Nach Applikation von Fotorezeptoraußensegmenten oder Chloroquin konnte bei den dominant vererbaren Bestrophin-1-Mutationen im Westernblot das 55 kDa-Proenzym nachgewiesen werden, was einer Funktionsstörung der Lysosomen entspricht. Daraus wurde geschlossen, dass

die dominanten Mutanten vermehrt in den Lysosomen abgebaut werden und dort akkumulieren können. Der endolysosomale Abbau scheint mit den zellulären Qualitätskontrollmechanismen verknüpft zu sein und der zellulären Proteinhomöostase zu dienen – eine Akkumulation mutanter Proteine könnte zu einer Überlastung der Proteindegradierung führen. Die rezessiv vererbaren Bestrophin-1-Mutationen scheinen nicht die Integrität des endolysosomalen Abbaus zu beeinflussen, für die rezessiven Mutationen war keine Änderungen des lysosomalen pH-Werts oder der Cathepsin-D-Spaltung nach induziertem Zellstress zu verzeichnen (Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020; Milenkovic et al., 2020).

Auch die Arbeitsgruppe um Singh et al. erhielt durch ihre Experimente Hinweise auf eine Überlastung des endolysosomalen Abbauweges (Singh et al., 2015): Sie beobachteten eine verstärkte Proteinoxidierung und verminderte Level an freiem Ubiquitin bei iPS-RPE-Zellen von an Morbus Best Erkrankten im Vergleich zu Gesunden. Diese Beobachtungen könnten jeweils bedingt sein durch eine Überlastung und Dysfunktion des endolysosomalen Abbauweges. Die zusätzlich gemessene verstärkte Exozytoserate könnte nach Aussagen der Autoren als Kompensationsweg für die Überlastung des endolysosomalen Abbaus betrachtet werden (Singh et al., 2015).

Das RPE weist eine hohe Phagozytosekapazität und dementsprechend auch eine hohe Anzahl an Lysosomen auf, um den Anfall großer Mengen an Fotorezeptoraußensegmenten abzubauen zu können. Ein inkompletter Abbau der aufgenommenen Fotorezeptoraußensegmente scheint zu einer Akkumulation als Lipofuszin in den Lysosomen zu führen (Nachtigal et al., 2020). Möglicherweise sind beim Morbus Best die Lipofuszinablagerungen im Bereich der Makula auf die übersättigte Abbaukapazität der Lysosomen zurückzuführen. Auch die multifokalen Läsionen bei Erkrankten mit autosomal-rezessiver Bestrophinopathie könnten durch die Ablagerungen inkorrekt gefalteter Proteine aufgrund der Überlastung des Proteinabbaus im ER bedingt sein (Milenkovic et al., 2020).

2) Assoziation von Bestrophin-1 und Lamp1 aufgrund einer Funktion als Ionenkanal:

Bestrophin-1 wird nicht nur als Anionenkanal in der Zellmembran beschrieben, sondern auch als Protein im endoplasmatischen Retikulum (Neussert et al., 2010; Barro-Soria et al., 2010). So wäre es eventuell auch sinnvoll, experimentell zu untersuchen, ob Bestrophin-1 eine Funktion in den Organellen des endolysosomalen Systems hat.

Zur Ansäuerung der Lysosomen durch die Vakuoläre H⁺-ATPasen wird auch kompensatorisch ein Transport von Gegenionen benötigt. Gegenionen kompensieren die Ladungsverschiebung und den osmotischen Gradienten, der sich durch den Ionentransport aufbaut. Somit würde, im Falle der Abwesenheit eines funktionstüchtigen Gegenionentransporters, der elektrochemische

Gradient der H⁺-Ionen eine weitere Azidifizierung verhindern. Während der Entwicklung von frühen Endosomen über späte Endosomen zu Lysosomen werden verschiedene Veränderungen in den Konzentrationen von Natrium (Abfall der Konzentration bis zu den Lysosomen), Kalium (Anstieg der Konzentration), Chlorid und Calcium (jeweils Anstieg der Konzentration von den frühen Endosomen zum Lysosom) beobachtet (Bouhamdani, Comeau und Turcotte, 2021). Für diese Ionenströme werden jeweils Ionenkanäle benötigt. Bestrophin-1 wurde bisher nicht als einer der Ionenkanäle in den Lysosomen identifiziert, es wäre aber möglich, zu untersuchen, ob Bestrophin-1 einen lysosomalen Ionenkanal darstellt. Um die Hypothese aufzustellen, dass Bestrophin-1 eine Funktion als Anionenkanal in Lysosomen hat, reichen immunzytochemische Färbungen nicht aus, Barral gibt einen Überblick über mögliche Experimente zur Untersuchung von Lysosomen (Barral et al., 2022).

3) Assoziation von Bestrophin-1 zu Lamp1 und EEA1 im Rahmen des Turnovers von Ionenkanälen:

Das Turnover von Ionenkanälen dient der Regulationen der Anzahl aktiver Ionenkanäle in der Zellmembran. Im Rahmen des Turnovers können Ionenkanäle wie Bestrophin-1 dann vermehrt in den frühen Endosomen vorkommen, um dann über die Lysosomen abgebaut oder über den Recycling-Weg wieder der Zellmembran zugeführt zu werden. Gerade auch die Überexpression von Bestrophin-1 oder die Expression fehlgefalteter Proteine könnten eine Internalisierung und lysosomalen Abbau fördern. Für Bestrophin-1-Mutanten wurden bereits hohe Turnoverraten in MDCK-II-Zellen beschrieben (Milenkovic et al., 2018; Nachtigal et al., 2020). So wäre es möglich, dass die teilweise hohen PCC-Werte (zwischen Bestrophin-1 und Lamp1/EEA1) durch das Turnover der Bestrophin-1-Kanäle bedingt sind.

9.2.1.1.2. Assoziation von Bestrophin-1 zu den frühen Endosomen

Weiterhin wurde die Assoziation von Bestrophin-1 zu den frühen Endosomen durch die Verwendung eines Anti-EEA1-Antikörpers untersucht. Wildtyp-Bestrophin-1 lag in den durchgeführten Färbungen zu 53% in den frühen Endosomen vor. Der PCC-Mittelwert zwischen EEA1 und Bestrophin-1 lag bei 0,533 (beim Wildtyp mit 4PBA-Applikation – denn beim Wildtyp ohne 4PBA-Applikation war die Immunzytochemie für diese Antikörperkombination nicht erfolgreich gewesen). Ähnlich wie bei den Erklärungsansätzen zur Lokalisation von Bestrophin-1 in den Lysosomen, gibt es auch verschiedene Möglichkeiten für die Lokalisation von Bestrophin-1 und seinen Mutanten in den frühen Endosomen:

- 1) Bestrophin-1 könnte im Rahmen des Turnovers von Ionenkanälen im endolysosomalen System vorliegen (letzter Abschnitt im vorherigen Kapitel),
- 2) Bestrophin-1 könnte aufgrund einer Retention in den frühen Endosomen vorliegen oder
- 3) Bestrophin-1 könnte in den frühen Endosomen eine Funktion als Anionenkanal haben.

Auf den ersten Erklärungsansatz wurde bereits im letzten Absatz des vorherigen Kapitels eingegangen, auf den zweiten und dritten Ansatz soll im Folgenden eingegangen werden.

2) Assoziation von Bestrophin-1 und EEA1 aufgrund einer Retention in den Endosomen:

Auch Milenkovic konnte bei einigen dominanten Bestrophin-1-Mutanten eine Kolo-kalisation mit EEA1 nachweisen, sowie mit dem Golgi-Apparat-Marker GM130 und mit BIP (binding immunoglobulin protein, ein Chaperon im Endoplasmatischen Retikulum) (Milenkovic et al., 2011). Dies diskutiert Milenkovic als teilweise Retention in den entsprechenden Zellorganellen (frühe Endosomen, Golgi-Apparat, ER) sowie eine gestörte Weiterverarbeitung (Milenkovic et al., 2011). Ähnlich wie bei den Beschreibungen zur Assoziation mit den Lysosomen (Kapitel 9.2.1.1.1.), wären in diesem Fall höhere PCC zwischen EEA1 und Bestrophin-1 bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu erwarten. Bei den Färbungen in Sample B wiesen die Mutanten höhere PCC-Mittelwerte auf als der Bestrophin-1-Wildtyp mit 0,533 – bei der Mutante T6P zeigte sich ein PCC-Mittelwert von 0,649 (ohne 4 PBA-Applikation) bzw. 0,581 (mit 4PBA-Applikation) und bei der Mutante D302A der Patientenzellen ein PCC-Mittelwert von 0,647 (ohne 4PBA-Applikation) bzw. 0,605 (mit 4PBA-Applikation). Bei den Färbungen des Samples A (in denen ausschließlich Patientenzellen verwendet wurden), waren noch höhere PCC-Mittelwerte zu verzeichnen als bei den endogenen Mutationen in Sample B. Hier zeigte sich ein PCC-Mittelwert von 0,685 (ohne 4PBA-Applikation) bzw. 0,698 (mit 4PBA-Applikation). So wären die Ergebnisse der für die Monographie durchgeführten Experimente im Einklang mit den Aussagen von Milenkovic (Milenkovic et al., 2011).

3) Assoziation von Bestrophin-1 und EEA1 aufgrund einer Funktion als Ionenkanal:

Eine andere Erklärung der Assoziation von Wildtyp-Bestrophin-1 mit den frühen Endosomen könnte in einer Funktion des Bestrophin-1-Ionenkanals in den frühen Endosomen gesucht werden. Um eine solche Überlegung aufzustellen, sollten jedoch die immunzytochemischen Experimente erweitert werden, um zuverlässige Aussagen zum intrazellulären Verhalten der Bestrophine machen zu können. Wildtyp-Bestrophin-1 liegt unter anderem in der basolateralen Zellmembran vor. Ein Teil ist auch intrazellulär lokalisiert, vermutlich im endoplasmatischen Retikulum (Barro-Soria et al., 2010; Neussert et al., 2010; Gómez, Tamm und Strauß, 2013). Dort scheint es die Aufnahme von Calcium in sowie die Freisetzung von Calcium aus Calciumspeichern im ER zu beeinflussen, möglicherweise indem es als Gegenion-Kanal fungiert (Barro-Soria et al., 2010; Neussert et al., 2010; Gómez, Tamm und Strauß, 2013). Auch aufgrund der für Bestrophin-1 bekannten Funktion als Ionenkanal im ER wäre es interessant zu untersuchen, ob Bestrophin-1 eine Funktion im frühen Endosom haben könnte.

Leider lassen die für diese Monographie durchgeführten Experimente nur eine begrenzte Aussage zum intrazellulären Verhalten (mutanter) Bestrophin-1-Proteine zu. Die für diese Monographie mit site-directed mutagenesis hergestellten Mutationen T6P, F80L und F305S

werden als Mutationen beschrieben, die zu einem deutlichen Trafficking-Defekt führen. So zeigten Experimente von Cordes et al. an Schweine-RPE-Zellen für die Mutationen T6P, F80L und F305S signifikant geringere PCC zwischen Bestrophin-1 und β -Catenin als Zellmarker im Vergleich zum Wildtyp (Cordes et al., 2020). Die Mutation R218C, die ebenfalls für diese Monographie mittels site-directed mutagenesis erzeugt wurde, zeigte bei Cordes et al. eine ähnliche zelluläre Lokalisation wie Wildtyp-Bestrophin-1 – denn R218C zeigte sich überwiegend in der Zellmembran und mit einem nur leicht reduzierten PCC zwischen Bestrophin-1 und β -Catenin im Vergleich zum Wildtyp (Cordes et al., 2020). So wäre es interessant weiter zu untersuchen, wie sich die genannten Mutanten (F80L, R218C und F305S) in ihrer intrazellulären Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Bestrophin-1 verhalten.

9.2.1.2. Zelluläre Lokalisation von $Ca_v1.3$ – einem wichtigen Interaktionspartner von Bestrophin-1

Bestrophin-1 kann die Aktivität von L-Typ-Calciumkanälen modulieren (Rosenthal et al., 2006). $Ca_v1.3$ stellt einen spannungsabhängigen Calciumkanal dar und wird als der vorherrschende L-Typ-Calciumkanal im RPE angesehen (Reichhart et al., 2010). β -Untereinheiten von $Ca_v1.3$ sind wichtig für deren Transport in die Zellmembran, und zudem modulieren sie die Aktivität der $Ca_v1.3$ -Kanäle (Reichhart et al., 2010). Über eine β -Untereinheit kann Bestrophin-1 mit $Ca_v1.3$ interagieren und die Kanalaktivität verändern (Cordes et al., 2020; Yu, Xiao, Cui et al., 2008; Reichhart et al., 2010).

Mit Färbungen unter Verwendung eines Anti- $Ca_v1.3$ -Antikörpers sowie eines Antikörpers gegen β -Catenin oder Lamp1 wurde das Expressionsverhalten von $Ca_v1.3$ in der Zellmembran beziehungsweise intrazellulär untersucht – die Ergebnisse werden in den beiden folgenden Kapiteln diskutiert. Wie bei den Färbungen mit den Bestrophin-1-Antikörpern erfolgten die Experimente an iPS-RPE-Zellen nach Transfektion von Wildtyp-Bestrophin-1 und der Mutation T6P (Sample B) sowie an Patientenzellen mit der endogenen Mutation D302A (in Sample A und in Sample B).

9.2.1.2.1. $Ca_v1.3$ in der Zellmembran in iPS-RPE-Zellen

In Sample A (ausschließlich Patientenzellen) wurde ein PCC-Mittelwert zwischen $Ca_v1.3$ und β -Catenin von 0,696 errechnet. β -Catenin stellt einen Zellmembranmarker dar und ein PCC von 0,696 zeigt an, dass ein großer Teil von $Ca_v1.3$ in der Zellmembran lokalisiert ist. Es wird beschrieben, dass β -Catenin zum Teil auch intrazellulär lokalisiert ist (Neussert et al., 2010), was auch bei der qualitativen Betrachtung des Samples A sichtbar wurde. Aus diesem Grund wurden für die Auswertung des Samples B nicht die PCC zwischen $Ca_v1.3$ und β -Catenin errechnet, sondern Pixelquotienten gebildet. Dabei wurden die $Ca_v1.3$ -Pixel der gesamten Zelle ins

Verhältnis gesetzt zu den Ca_v1.3-Pixeln im Zellinneren. Auch für β -Catenin wurden für jede Zelle die Pixelquotienten gebildet von β -Catenin gesamt zu β -Catenin intrazellulär. Die Pixelquotienten von Ca_v1.3 lagen für die einzelnen Färbungen zwischen 1,4 und 1,9. Es scheint somit, dass Ca_v1.3 in den gefärbten Zellen sowohl im Zellinneren vorlag als auch zu einem etwas höheren Anteil im Zellrandbereich, im Bereich der Zellmembran. Für β -Catenin als Zellmembranmarker wären idealerweise sehr hohe Pixelquotienten zu erwarten, jedoch waren in einigen Zellen viele β -Catenin-Pixel auch intrazellulär zu finden.

In anderen Studien ergaben sich höhere Quotienten für Ca_v1.3 und β -Catenin bei etwas anderem, aber ähnlichem Vorgehen (Reichhart et al., 2010). Reichhart et al. untersuchten ARPE-19-Zellen und berechneten das Verhältnis von den Fluoreszenz-Signalen von Ca_v1.3 zwischen Zellmembran und Zellinnerem. Dort ergab sich ein Quotient von 3,6 für Ca_v1.3. Für Bestrophin-1 wurde ein Quotient von 4,8 errechnet (Reichhart et al., 2010). Es wird beschrieben, dass Bestrophin-1 über eine prolinreiche Region im C-Terminus (zwischen den Aminosäuren 330 und 346) an die β -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals Ca_v1.3 bindet. Eine Entfernung der prolinreichen Region führte zu einer schwächeren Kolo-kalisation von Bestrophin-1 und Ca_v1.3 in der Zellmembran (Reichhart et al., 2010). Aber auch andere Mutationen, außerhalb dieser prolinreichen Region veränderten das Expressionsverhalten von Ca_v1.3. In Experimenten an CHO-K1-Zellen konnten Cordes et al. zeigen, dass die Mutationen T6P, F80L und F305S jeweils in einer geringeren Expression von Ca_v1.3 in der Zellmembran und in einer geringeren Kolo-kalisation von Bestrophin-1 und Ca_v1.3 resultierten (Cordes et al., 2020). Auch in den humanen iPSC-RPE führte T6P zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Bestrophin-1 und von Ca_v1.3 in der Zellmembran (Cordes et al., 2020).

Da die der Monographie zugrundeliegenden Färbungen lückenhaft sind, sind Aussagen zur Lokalisation von Ca_v1.3 nicht zuverlässig. In Sample B waren die Färbungen ohne 4PBA-Applikation beim Wildtyp-Bestrophin-1 und bei den Patientenzellen jeweils nicht verwendbar gewesen. Beim Wildtyp mit 4PBA-Applikation wurde für Ca_v1.3 ein Pixelquotient (Pixel insgesamt / Pixel intrazellulär) von 1,7 errechnet. Nach den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen (Cordes et al., 2020; Reichhart et al., 2010), wären bei den Mutationen geringere Pixelquotienten für Ca_v1.3 zu erwarten. Für die Mutation T6P (ohne 4PBA-Applikation) wurde mit 1,461 ein etwas geringerer Ca_v1.3-Pixelquotient im Vergleich zum Wildtyp errechnet – was sich mit der geringeren Zellmembranexpression von Ca_v1.3 bei Cordes et al. deckt (Cordes et al., 2020). Bei der Färbung von T6P mit 4PBA-Applikation wurde mit 1,819 jedoch ein etwas höherer Ca_v1.3-Pixelquotient als beim Wildtyp errechnet. Die Patientenzellen (mit 4PBA-Applikation) zeigten mit einem Ca_v1.3-Pixelquotienten von 1,53 einen geringeren Pixelquotienten als der Wildtyp, was den Erwartungen entsprechen würde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den der Monographie

zugrundeliegenden Experimenten zur Zellmembranexpression von $Ca_v1.3$, die in vorherigen Studien beschriebenen Ergebnisse aus ähnlichen Experimenten nur teilweise bestätigen ließen. Dies könnte wesentlich durch die eingeschränkte Qualität der Färbungen und die geringe Anzahl ausgewerteter Zellen bedingt sein. Deshalb sollten die Experimente gegebenenfalls wiederholt werden nach vorheriger Optimierung der Kultivierung und Färbung der iPS-RPE-Zellen.

9.2.1.2.1. $Ca_v1.3$ in Lysosomen in iPS-RPE-Zellen

Wenn Bestrophin-1-Proteine und $Ca_v1.3$ mutationsbedingt vermindert in der Zellmembran exprimiert werden, könnte deren Lokalisation in den Lysosomen ihrem dortigen Abbau zugeschrieben werden. Dann wären höhere PCC zwischen $Ca_v1.3$ und Lamp1 bei den Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Bestrophin-1 zu erwarten. Die Färbungen zeigten das gegenteilige Verhalten: In Sample B zeigte der Wildtyp einen PCC-Mittelwert zwischen $Ca_v1.3$ und Lamp1 von 0,465. Beide untersuchten Mutationen zeigten einen geringeren PCC-Mittelwert (T6P mit einem PCC von 0,421 und die Mutation D302A der Patientenzellen mit einem PCC von 0,358). Somit können diese Experimente nicht die Hypothese untermauern, dass Bestrophin-1-Mutationen zu einem vermehrten Abbau von $Ca_v1.3$ in den Lysosomen führen. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei den Färbungen nur eine geringe Anzahl von Zellen vorlagen – bei der Färbung vom Wildtyp (ohne 4PBA-Applikation) konnten nur 4 verwertbare Zellen aufgefunden werden – das schränkt mögliche Aussagen ein.

Beim Vergleichen der Färbungen mit der Antikörperkombination Anti- $Ca_v1.3$ /Lamp1 mit Anti-Bestrophin-1/Lamp1 ist ersichtlich, dass die Färbung Anti-Bestrophin-1/Lamp1 etwas höhere PCC erbrachte als die Färbung Anti- $Ca_v1.3$ /Lamp1. Damit könnte die Überlegung aufgestellt werden, ob Bestrophin-1-Mutationen zu einem vermehrten Abbau von Bestrophin-1-Proteinen in Lysosomen führen, nicht/weniger jedoch zu einem Abbau von $Ca_v1.3$ in den Lysosomen. Um fundierte Aussagen zu diesen Überlegungen machen zu können, wären mehr Färbungen mit reproduzierbare Ergebnisse nötig.

Ähnlich wie bei Bestrophin-1 könnte der Nachweis von $Ca_v1.3$ im endolysosmalen System durch das Turnover des $Ca_v1.3$ -Calciumkanals bedingt werden. Als spannungsabhängige Calciumkanäle, die das Calciumsignalling dominieren, muss die Expression von $Ca_v1.3$ fein reguliert sein. Die Expression könnte möglicherweise über ein bedarfsabhängiges Turnover reguliert werden, und die Präsenz im endolysosomalen System damit erklären. Je nach Bedarf an $Ca_v1.3$ -Kanälen in der Zellmembran wären dann weniger oder mehr $Ca_v1.3$ -Kanäle in den Lysosomen zu finden.

9.2.2. Therapiemöglichkeiten – ist Natriumphenybutyrat bei Morbus Best wirksam?

Die immunzytochemischen Färbungen erfolgten sowohl an iPSC-RPE, die mit Natriumphenybutyrat (4PBA) inkubiert waren als auch an iPSC-RPE ohne 4PBA-Inkubation. Damit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob 4PBA helfen kann, mutante Bestrophin-1-Proteine richtig zu falten. Ein erfolgreiches Wirken von 4PBA wäre daran erkenntlich, dass mutante Bestrophin-1-Proteine, für die ein Trafficking-Defekt bekannt ist, wieder vermehrt an der eigentlichen Lokalisation vorzufinden sind – in der basolateralen Zellmembran und im Endoplasmatischen Retikulum (Marmorstein et al., 2000b; Neussert et al., 2010; Gómez, Tamm und Strauß, 2013). Für einen Therapieerfolg von 4PBA sollte sich zudem die Funktion von Bestrophin-1 signifikant verbessern. Mit den immunzytochemischen Experimenten kann nur der Frage nach einer Verbesserung des Proteintransports nachgegangen werden. Mit den hier durchgeführten Experimenten lassen sich aufgrund zu geringer Datendichte keine verlässlichen konkreten Aussagen zum Verhalten mutanter Bestrophine treffen. Das macht die Beurteilung, ob 4PBA erfolgreich den Proteintransport verbessert, noch schwieriger zu beantworten. Zudem sind die Färbungen lückenhaft, denn drei von 24 Färbungen in Sample B waren nicht auswertbar gewesen.

In Sample A führte die Applikation von 4PBA zu einer Reduktion des PCC zwischen Bestrophin-1 und Lamp1 von 0,873 auf 0,798. Bei den restlichen Antikörperkombinationen blieben die PCC nach 4PBA-Applikation fast identisch. Diese Ergebnisse könnten so interpretiert werden, dass 4PBA zu einem kleinen Teil fehlgefaltete Bestrophin-1-Proteine durch eine Faltungskorrektur vor dem lysosomalen Abbau schützen kann. Auf die Korrelation von Bestrophin-1 und EEA1 schien 4PBA nach diesen Ergebnissen keinen Einfluss zu haben. Auch das Trafficking-Verhalten von $Ca_v1.3$ schien nicht durch 4PBA beeinflussbar. Da $Ca_v1.3$ keine Mutation trägt, sondern nur indirekt durch die Bestrophin-1-Mutation einen Trafficking-Defekt aufweist (Cordes et al., 2020), würden diese Ergebnisse in das Bild passen. Jedoch wäre es für einen sinnvollen Therapieeinsatz von 4PBA wichtig, dass die Funktion von Bestrophin-1 wiederhergestellt wird – dazu gehört auch die korrekte Funktion der Interaktionspartner, die nur durch deren korrekte Lokalisation gegeben ist, im Fall von $Ca_v1.3$ in der Zellmembran.

Auch in Sample B war das Bild der 4PBA-Auswirkungen heterogen: Bei den Patientenzellen führte 4PBA zu einer Reduktion des PCC zwischen Bestrophin-1 und Lamp1 im Vergleich zum Wildtyp, bei der Mutante T6P führte die 4PBA-Applikation jedoch zu einer Steigerung des PCC. Bei der Färbung mit den Antikörpern gegen Bestrophin-1 und EEA1 in Sample B führte die 4PBA-Applikation zu einer Reduktion der PCC bei beiden Mutanten – nach 4PBA-Applikation war also weniger mutiertes Bestrophin-1 in den frühen Endosomen. Bei den Färbungen zu $Ca_v1.3$ /Lamp1 in Sample B führte 4PBA zu einer Steigerung der PCC zwischen $Ca_v1.3$ und Lamp1 bei beiden

Mutanten – es war also mehr Cav1.3 in den Lysosomen vorzufinden nach 4PBA-Applikation als ohne Zusatz von 4PBA. Insgesamt sind die Ergebnisse widersprüchlich bezüglich des Effekts von 4PBA auf die Lokalisation von Bestrophin-1 und Cav1.3 in Lysosomen und frühen Endosomen in iPS-RPE-Zellen mit mutiertem Bestrophin-1 und lassen dadurch keine konkreten Schlussfolgerungen zu.

Falls die Überlegung zutreffen würde, dass Bestrophin-1 eine Funktion in den frühen Endosomen oder in den Lysosomen ausübt, so wäre die korrekte Lokalisation von Bestrophin-1 im endolysosmalen System nötig. Ein wirksamer Chaperon müsste in diesem Fall den korrekten Transport der mutierten und fehllokalisierten Proteine in die Membranen der frühen Endosomen und Lysosomen ermöglichen – also zu einer Steigerung der PCC zwischen Bestrophin-1 und EEA1/Lamp1 führen.

Insgesamt kann durch die durchgeführten Experimente keine verlässliche Aussage getroffen werden, ob 4PBA die physiologische Expression von den untersuchten Bestrophin-1-Mutanten wiederherstellen kann. Milenkovic et al. (Milenkovic et al., 2020) beschrieben, dass Chaperone bei einigen Mutationsklassen der Bestrophinopathien denkbar wären. Die Therapie mit Chaperonen wäre denkbar bei den autosomal-rezessiven Mutationen, die zu einem verfrühten Abbau innerhalb des ER führen und sie wäre denkbar bei den Mutationen, die zu einem Proteinabbau außerhalb des ER führen, beispielsweise im Golgi-Apparat. Der Proteinabbau nach Durchlaufen der Prozessierung im ER (z.B. im Golgi-Apparat) trifft auf die Mehrzahl der Mutanten beim Morbus Best zu. Für mutante Proteine mit unterschiedlichen Abbauorten wären wahrscheinlich jeweils andere Wirkstoffe nötig (Milenkovic et al., 2020).

Mit Westernblot-Experimenten an MDCK-II-Zellen konnten Milenkovic et al. zeigen, dass eine 4PBA-Applikation bei zwei rezessiven Mutationen, R141H und A195V, zu einer verstärkten Bestrophin-1-Expression führte. Dagegen konnte bei den dominanten Mutanten T6P und W93C keine Erhöhung der Proteinexpression durch 4PBA-Applikation hervorgerufen werden (Milenkovic et al., 2018). Auch die hier untersuchten Mutationen (T6P und die endogenen Mutationen der Patientenzellen) sind autosomal-dominant vererbte Mutationen. Weiterhin konnten Uggenti et al. bei vier ARB-Mutanten – die alle intrazellulär vorgefunden wurden und eine eingeschränkte Chloridleitfähigkeit aufwiesen – zeigen, dass 4PBA die zuvor eingeschränkte Chloridleitfähigkeit wiederherstellen konnte. Die Kombination von 4PBA und Bortezomib, einem Proteasom-Inhibitor, konnte zudem den Transport zur Plasmamembran verbessern. Beide Substanzen sind schon für den klinischen Einsatz zugelassen, jedoch für andere Indikationen als Morbus Best (Uggenti, Briant, Streit et al., 2016).

Für Morbus Best-Mutationen testeten Singh et al. den therapeutischen Einsatz von Valproat (ein Antikonvulsivum) und Rapamycin (ein Immunsuppressivum, auch bekannt als Sirolimus): An iPSC-RPE mit Morbus Best tragenden Mutationen konnte der Abbau der Fotorezeptoraußensegmente durch den Einsatz von Valproat allein oder durch die Kombination von Valproat und Rapamycin verbessert werden (Singh et al., 2015). Zuvor konnten Singh et al. einen verlangsamten Abbau der Fotorezeptoraußensegmente bei Morbus Best-Mutationen zeigen (Singh et al., 2013b). Die beobachtete Wirkung könnte auf direkte Effekte zurückgeführt werden – Valproat erhöht die Proteindegradierung und Rapamycin induziert Autophagie – oder auf indirekte Effekte, da beide Substanzen pleiotrope Wirkungen besitzen (Singh et al., 2015). Zudem konnte Valproat das Fortschreiten von Morbus Best im Hundemodell verlangsamen (Singh et al., 2015). Der therapeutische Effekt von Valproat und Rapamycin ist zudem ein weiterer Hinweis darauf, dass eine gestörte Proteindegradierung einen pathophysiologischen Mechanismus bei Morbus Best darstellen kann (Singh et al., 2015).

Die in der Literatur beschriebenen bisherigen Untersuchungen zu verschiedenen Substanzen zur Therapie des Morbus Best haben bisher noch zu keiner Zulassung einer geeigneten Therapie geführt. Deshalb sollten die bisher getesteten Substanzen gegebenenfalls weiter untersucht und neue Substanzen ausprobiert werden, um langfristig Therapiemöglichkeiten zu finden. Aufgrund vieler in-vivo-Eigenschaften können iPSC-RPE-Zellen in vielen Fällen ein geeignetes Zellmodell darstellen. Zur Suche nach möglichen Chaperonen für autosomal-dominant vererbte Morbus Best-Mutationen wäre ein Substanz-Screening nötig, um zeitlich viele verschiedene Substanzen auf ihre Wirksamkeit testen zu können. Die Testung einer einzelnen Substanz, wie 4PBA in den hier durchgeführten Experimenten, stellt ein ineffektives Vorgehen dar. Die Chaperon-Funktion und seine Effizienz für ein bestimmtes Protein sind nicht vorhersehbar. Deshalb müsste ein einfaches Testsystem für die Funktionsdarstellung des RPE gefunden werden, an dem ein systematisches Screening von Substanzen aus einer möglichst großen Substanzbibliothek durchgeführt werden kann.

9.2.3. Diskussion zur Qualität der Immunzytochemie an iPSC-RPE-Zellen

Mit nur zwei unabhängigen Färbereihen (Sample A und Sample B) ist die fundierte Aussagekraft der Experimente an iPSC-RPE begrenzt. Zudem sind die gewonnenen Daten teilweise heterogen, etwas lückenhaft und Erkenntnisse aus anderen Studien konnten teilweise nicht reproduziert werden, was die Aussagekraft weiter limitiert.

Qualitätskontrollen, wie die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands zur Überprüfung funktionstüchtiger Tight Junctions, wurden schon bei der Herstellung der iPSC-RPE durch den Hersteller durchgeführt. Der Transport vom Herstellerlabor nach Berlin und die

Lagerung in Flüssigstickstoff über eine längere Zeit könnten Stressoren für die voll-differenzierten intakten iPSC-RPE darstellen. Aber vor allem während der Kultivierung der iPSC-RPE in Berlin, während der Transfektion und der Färbungen kommen weitere Stressoren hinzu, die die Qualität der Zellen und der Färbungen beeinträchtigen können.

In Sample B waren teilweise länglich-ovale bis spindelförmige Zellen vorzufinden (beispielsweise sichtbar in Abbildung 16B, Wildtyp mit 4PBA, mit der Antikörperkombination Anti-Bestrophin-1/Anti-Lamp1). In der Literatur wird beschrieben, dass iPSC-RPE bei der Dedifferenzierung von RPE-Zellen zu mesenchymalen Zellen eine spindelförmige oder fibroblastenähnliche Morphologie annehmen (Buchholz et al., 2009; Singh et al., 2013a; Grisanti und Guidry, 1995; Kokkinaki, Sahibzada und Golestaneh, 2011). Von der Morphologie her zu urteilen, wäre es möglich, dass diese länglich-ovalen bis spindelförmigen Zellen, Zellen während ihrer Dedifferenzierung darstellen. Es erfolgte hier keine Überprüfung, ob eine Dedifferenzierung stattgefunden haben könnte. Bei einer Dedifferenzierung wäre eine Expression von mesenchymalen Markern und die Abnahme der Expression von RPE-Markerproteinen zu erwarten (Singh et al., 2013a). Eine beginnende Dedifferenzierung der iPSC-RPE würde die Qualität und die Aussagekraft der immunzytologischen Färbungen reduzieren.

Die Kultivierung, die Färbungen und das Mikroskopieren der iPSC-RPE waren schwieriger als die Kultivierung und die Experimente an HEK293-Zellen zu Anoctamin-4. Jedoch weisen die iPSC-RPE-Modelle gegenüber anderen in-vitro-RPE-Zellmodellen wichtige Vorteile auf, wie in der Einleitung in Kapitel 4.3.6 beschrieben. iPSC-RPE repräsentieren in-vivo-RPE-Zellen morphologisch und funktionell sehr gut (Singh et al., 2015). Da teilweise unterschiedliche Beobachtungen bezüglich des Traffickings gemacht wurden, empfiehlt Johnson et al., Trafficking-Experimente auch im RPE-System zu überprüfen (Johnson et al., 2017). Dies ist ein Grund für die Wahl der iPSC-RPE-Zellen zur Immunzytochemie zu Bestrophin-1. Ein weiterer Vorteil der iPSC-RPE liegt in deren Expression von Bestrophin-1. Die Expression von endogenem Bestrophin-1 ermöglicht es, auch Zellen von Patienten/Patientinnen spezifisch zu untersuchen. Von Erkrankten gewonnene iPSC-RPE exprimieren endogen Bestrophin-1 heterolog, also sowohl das mutierte Allel als auch das Wildtyp-Allel. Dies kommt einem in-vivo-Zellmodell näher als einem RPE-Zellmodell aus tierischem Gewebe, in dem endogenes Wildtyp exprimiert wird und mutiertes Bestrophin-1 transfiziert werden muss, wie bei Cordes et al. (Cordes et al., 2020). MDCK-II-Zellen, die nur exogenes Bestrophin-1 exprimieren, wie bei Milenkovic et al., rücken noch weiter von in-vivo-Situationen ab (Milenkovic et al., 2011). Die Verwendung von iPSC-Modellen ist gerade bei Erkrankungen vorteilhaft, die eine breite Genotyp-Phänotyp-Variabilität aufweisen, so wie Morbus Best (Singh et al., 2015).

Es ist zu beachten bei den iPSC-RPE, dass sich verschiedene Zelllinien teilweise voneinander unterscheiden können. Es wurden auch Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien desselben Spenders/derselben Spenderin beobachtet (Marmorstein et al., 2018; Cordes et al., 2020; Kilpinen, Goncalves, Leha et al., 2017). So empfiehlt es sich, gegebenenfalls mehrere Zelllinien derselben Patientin/desselben Patienten zu untersuchen und diese weiterhin mit Zellen von anderen Erkrankten mit der gleichen Mutation zu vergleichen (Kilpinen et al., 2017). Diese beschriebene Heterogenität unter den verschiedenen iPSC-RPE-Zelllinien könnte auch eine Erklärung für die teilweise unterschiedliche Morphologie der iPSC-RPE und die teilweise heterogenen PCC beim Vergleich der beiden Samples A und B sein.

iPS-Zellen haben, wie auch andere in-vitro-Modelle, den Nachteil, dass bei der Suche nach potenziellen Wirkstoffen nicht deren Bioverfügbarkeit oder der Effekt auf mögliche Sehveränderungen untersucht werden kann (Singh et al., 2015). Selbst falls 4PBA sich als idealer Chaperon für die untersuchten Mutationen in der Immunzytochemie der iPSC-RPE-Zellen dargestellt hätte, hätten somit anschließend noch keine konkreten Aussagen zu einer möglichen Sehbesserung durch 4PBA bei an Morbus Best Erkrankten getroffen werden können.

9.3. Schlussfolgerungen zu den untersuchten Channelopathies

Der durch Bestrophin-1-Mutationen verursachte Morbus Best und die durch Anoctamin-4-Mutationen bedingten Epilepsien stellen jeweils Ionenkanalerkrankungen im großen und diversen Feld der Channelopathies dar.

Anoctamin-4 ist ein bisher noch wenig erforschtes Protein. Die hier untersuchten Mutationen wurden erstmals durch Yang et al. als Ursachen für verschiedene Epilepsien beschrieben. Die immunzytochemischen Färbungen stellen eine der ersten Experimente in der Grundlagenforschung zu diesen sieben Mutationen dar. Mit umfangreichen Färbungen und hohen Stichprobengrößen können konkrete und fundierte Aussagen zum zellulären Verhalten von Anoctamin-4 und den untersuchten Mutationen in HEK293-Zellen getroffen werden: Wildtyp-Anoctamin-4 liegt zu etwa 56% in der Zellmembran der HEK-Zellen vor. Der restliche Anteil liegt im Zytosol vor und dabei zu großen Teilen in den frühen Endosomen. Die untersuchten Anoctamin-4-Mutationen führen zu einer signifikant geringeren Expression von Anoctamin-4 in der Zellmembran und in den frühen Endosomen im Vergleich zum Wildtyp, jedoch zu keinen Unterschieden hinsichtlich der Lokalisation in den Lysosomen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Transport der Anoctamin-4-Kanäle in die Zellmembran eingeschränkt ist und einen möglichen Pathomechanismus für die Entstehung der Epilepsien darstellen kann. Der beeinträchtigte Proteintransport der Mutanten ist jedoch milder ausgeprägt als die durch Yang et al. beschriebenen Funktionseinschränkungen in Patch Clamp Experimenten. Zur intrazellulären

Lokalisation von Anoctamin-4 lässt sich schlussfolgern, dass die untersuchten Anoctamin-4-Mutanten zu keiner Akkumulation im endolysosomalen System führen. Die hohe Expressionsrate in den frühen Endosomen könnte möglicherweise auf eine große Turnoverrate und/oder eine Funktion von Anoctamin-4 in den frühen Endosomen zurückgeführt werden – mit jeweils Störungen im Turnover und in der Expression bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Für diese möglichen Erklärungsansätze bedarf es aber weiterer Forschung, um sie zu bestätigen oder auszuschließen. Natriumphenylbutyrat zeigte keine Verbesserung der Zellmembranexpression der Mutanten und scheint damit kein potenziell kausaler Therapieansatz zu sein. Es bedarf weiterer Forschung, um die Funktion von Anoctamin-4 weiter zu charakterisieren und die Mutationsauswirkungen besser zu verstehen. Zwar können Epilepsien teilweise symptomatisch mit antikonvulsiven Medikamenten behandelt werden, jedoch sollte das Ziel der weiteren Forschung an Anoctamin-4 sein, potenzielle kausale Therapieansätze für die durch Anoctamin-4 verursachten Channelopathies in Form verschiedener Epilepsien zu entwickeln.

Bestrophin-1 und Morbus Best sind deutlich besser erforscht im Vergleich zu Anoctamin-4. Die Immunzytochemie zu Bestrophin-1 an iPS-RPE-Zellen bietet viele Vorteile gegenüber anderen Zellmodellen. Jedoch sind die iPS-RPE-Zellen deutlich anspruchsvoller und weniger robust im Vergleich zu beispielsweise HEK293-Zellen. Das ist mit ein Grund, weshalb die Qualität der durchgeführten Immunzytochemie an iPS-RPE-Zellen und deren Datendichte eingeschränkt sind. Es lassen sich keine konkreten validen Aussagen zum zellulären Verhalten von Bestrophin-1 und seinem Interaktionspartner Cav1.3 treffen, und die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse konnten nur teilweise repliziert werden. Auch aus diesem Grund sollten Bestrophin-1-Wildtyp und -Mutationen weiter untersucht werden. Die Experimente zu Bestrophin-1 sollten auch in iPS-RPE-Zellen durchgeführt werden, da sie als Zellmodell auch viele in-vivo-Charakteristika aufweisen. Dabei sollten die Protokolle zur Kultivierung und zur Färbung der iPS-RPE weiter optimiert werden. Für Morbus Best existieren bisher keine Therapieansätze und es wäre wünschenswert, durch die weitere Forschung an Bestrophin-1 und seinen Mutationen therapeutische Möglichkeiten für diese Channelopathie zu entwickeln.

10. Literaturverzeichnis

- Al Sharie, A. H., Al Zu'bi, Y. O., El-Elimat, T., Al-Kammash, K., Abu Lil, A., Isawi, I. H., Al Sharie, S., Abu Mousa, B. M., Al Malkawi, A. A. & Alali, F. Q. 2023. ANO4 Expression Is a Potential Prognostic Biomarker in Non-Metastasized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Pers Med*, 13.
- Athanasiau, L., Mattingsdal, M., Kähler, A. K., Brown, A., Gustafsson, O., Agartz, I., Giegling, I., Muglia, P., Cichon, S., Rietschel, M., Pietiläinen, O. P., Peltonen, L., Bramon, E., Collier, D., Clair, D. S., Sigurdsson, E., Petursson, H., Rujescu, D., Melle, I., Steen, V. M., Djurovic, S. & Andreassen, O. A. 2010. Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort. *J Psychiatr Res*, 44, 748-53.
- Balasubramanian, K. & Schroit, A. J. 2003. Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu Rev Physiol*, 65, 701-34.
- Barral, D. C., Staiano, L., Guimas Almeida, C., Cutler, D. F., Eden, E. R., Futter, C. E., Galione, A., Marques, A. R. A., Medina, D. L., Napolitano, G., Settembre, C., Vieira, O. V., Aerts, J., Atakpa-Adaji, P., Bruno, G., Capuozzo, A., De Leonibus, E., Di Malta, C., Escrevente, C., Esposito, A., Grumati, P., Hall, M. J., Teodoro, R. O., Lopes, S. S., Luzio, J. P., Monfregola, J., Montefusco, S., Platt, F. M., Polishchuck, R., De Risi, M., Sambri, I., Soldati, C. & Seabra, M. C. 2022. Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic*, 23, 238-269.
- Barro-Soria, R., Aldehni, F., Almaça, J., Witzgall, R., Schreiber, R. & Kunzelmann, K. 2010. ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel. *Pflugers Arch*, 459, 485-97.
- Bitner, H., Schatz, P., Mizrahi-Meissonnier, L., Sharon, D. & Rosenberg, T. 2012. Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark. *Am J Ophthalmol*, 154, 403-412.e4.
- Boon, C. J., Klevering, B. J., Leroy, B. P., Hoyng, C. B., Keunen, J. E. & Den Hollander, A. I. 2009. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res*, 28, 187-205.
- Bouhamdani, N., Comeau, D. & Turcotte, S. 2021. A Compendium of Information on the Lysosome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Brunner, J. D., Lim, N. K., Schenck, S., Duerst, A. & Dutzler, R. 2014. X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature*, 516, 207-12.
- Buchholz, D. E., Hikita, S. T., Rowland, T. J., Friedrich, A. M., Hinman, C. R., Johnson, L. V. & Clegg, D. O. 2009. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27, 2427-34.
- Cabrita, I., Benedetto, R., Fonseca, A., Wanitchakool, P., Sirianant, L., Skryabin, B. V., Schenk, L. K., Pavenstädt, H., Schreiber, R. & Kunzelmann, K. 2017. Differential effects of anoctamins on intracellular calcium signals. *Faseb j*, 31, 2123-2134.
- Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O. & Galletta, L. J. 2008. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*, 322, 590-4.
- Carr, A. J., Vugler, A. A., Hikita, S. T., Lawrence, J. M., Gias, C., Chen, L. L., Buchholz, D. E., Ahmado, A., Semo, M., Smart, M. J., Hasan, S., Da Cruz, L., Johnson, L. V., Clegg, D. O. & Coffey, P. J. 2009. Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One*, 4, e8152.
- Claes, L., Audenaert, D., Deprez, L., Van Paesschen, W., Depondt, C., Goossens, D., Del-Favero, J., Van Broeckhoven, C. & De Jonghe, P. 2004. Novel locus on chromosome 12q22-q23.3 responsible for familial temporal lobe epilepsy associated with febrile seizures. *J Med Genet*, 41, 710-4.
- Cordes, M., Bucichowski, P., Alfaar, A. S., Tsang, S. H., Almedawar, S., Reichhart, N. & Strauß, O. 2020. Inhibition of Ca(2+) channel surface expression by mutant bestrophin-1 in RPE cells. *Faseb j*, 34, 4055-4071.
- Crottès, D. & Jan, L. Y. 2019. The multifaceted role of TMEM16A in cancer. *Cell Calcium*, 82, 102050.

- Den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A. F., Smith, T., Antonarakis, S. E. & Taschner, P. E. 2016. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*, 37, 564-9.
- Duran, C., Qu, Z., Osunkoya, A. O., Cui, Y. & Hartzell, H. C. 2012. ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl⁻ channel family are intracellular proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302, C482-93.
- Estadella, I., Pedrós-Gámez, O., Colomer-Molera, M., Bosch, M., Sorkin, A. & Felipe, A. 2020. Endocytosis: A Turnover Mechanism Controlling Ion Channel Function. *Cells*, 9.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T. & Jentsch, T. J. 1999. Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem*, 274, 896-902.
- Gioia, R., Tonelli, F., Ceppi, I., Biggiogera, M., Leikin, S., Fisher, S., Tenedini, E., Yorgan, T. A., Schinke, T., Tian, K., Schwartz, J. M., Forte, F., Wagener, R., Villani, S., Rossi, A. & Forlino, A. 2017. The chaperone activity of 4PBA ameliorates the skeletal phenotype of Chihuahua, a zebrafish model for dominant osteogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*, 26, 2897-2911.
- Gómez, N. M., Tamm, E. R. & Strauß, O. 2013. Role of bestrophin-1 in store-operated calcium entry in retinal pigment epithelium. *Pflugers Arch*, 465, 481-95.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- Grisanti, S. & Guidry, C. 1995. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, 391-405.
- Gumbiner, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 622-34.
- Happ, H. C. & Carvill, G. L. 2020. A 2020 View on the Genetics of Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Epilepsy Curr*, 20, 90-96.
- Hartzell, H. C., Qu, Z., Yu, K., Xiao, Q. & Chien, L. T. 2008. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol Rev*, 88, 639-72.
- Hartzell, H. C., Yu, K., Xiao, Q., Chien, L. T. & Qu, Z. 2009. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Physiol*, 587, 2127-39.
- Hazim, R. A., Karumbayaram, S., Jiang, M., Dimashkie, A., Lopes, V. S., Li, D., Burgess, B. L., Vijayaraj, P., Alva-Ornelas, J. A., Zack, J. A., Kohn, D. B., Gomperts, B. N., Pyle, A. D., Lowry, W. E. & Williams, D. S. 2017. Differentiation of RPE cells from integration-free iPS cells and their cell biological characterization. *Stem Cell Res Ther*, 8, 217.
- Hemmerich, W. 2018. *StatistikGuru: Normalverteilung online prüfen* [Online]. Available: <https://statistikguru.de/rechner/normalverteilung-rechner.html> [Accessed 29.04.2022 2022].
- Hendrickx, D. a. E., Van Scheppingen, J., Van Der Poel, M., Bossers, K., Schuurman, K. G., Van Eden, C. G., Hol, E. M., Hamann, J. & Huitinga, I. 2017. Gene Expression Profiling of Multiple Sclerosis Pathology Identifies Early Patterns of Demyelination Surrounding Chronic Active Lesions. *Front Immunol*, 8, 1810.
- Jentsch, T. J. & Pusch, M. 2018. ClC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. *Physiol Rev*, 98, 1493-1590.
- Ji, Q., Guo, S., Wang, X., Pang, C., Zhan, Y., Chen, Y. & An, H. 2019. Recent advances in TMEM16A: Structure, function, and disease. *J Cell Physiol*, 234, 7856-7873.
- Johnson, A. A., Guziewicz, K. E., Lee, C. J., Kalathur, R. C., Pulido, J. S., Marmorstein, L. Y. & Marmorstein, A. D. 2017. Bestrophin 1 and retinal disease. *Prog Retin Eye Res*, 58, 45-69.
- Johnson, A. A., Lee, Y. S., Stanton, J. B., Yu, K., Hartzell, C. H., Marmorstein, L. Y. & Marmorstein, A. D. 2013. Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. *Hum Mol Genet*, 22, 4688-97.
- Kalienkova, V., Clerico Mosina, V., Bryner, L., Oostergetel, G. T., Dutzler, R. & Paulino, C. 2019. Stepwise activation mechanism of the scramblase nhTMEM16 revealed by cryo-EM. *Elife*, 8.
- Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S. & Kanneganti, T. D. 2020. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu Rev Immunol*, 38, 567-595.

- Kilpinen, H., Goncalves, A., Leha, A., Afzal, V., Alasoo, K., Ashford, S., Bala, S., Bensaddek, D., Casale, F. P., Culley, O. J., Danecek, P., Faulconbridge, A., Harrison, P. W., Kathuria, A., Mccarthy, D., Mccarthy, S. A., Meleckyte, R., Memari, Y., Moens, N., Soares, F., Mann, A., Streeter, I., Agu, C. A., Alderton, A., Nelson, R., Harper, S., Patel, M., White, A., Patel, S. R., Clarke, L., Halai, R., Kirton, C. M., Kolb-Kokocinski, A., Beales, P., Birney, E., Danovi, D., Lamond, A. I., Ouwehand, W. H., Vallier, L., Watt, F. M., Durbin, R., Stegle, O. & Gaffney, D. J. 2017. Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature*, 546, 370-375.
- Kim, J. B. 2014. Channelopathies. *Korean J Pediatr*, 57, 1-18.
- Kokkinaki, M., Sahibzada, N. & Golestaneh, N. 2011. Human induced pluripotent stem-derived retinal pigment epithelium (RPE) cells exhibit ion transport, membrane potential, polarized vascular endothelial growth factor secretion, and gene expression pattern similar to native RPE. *Stem Cells*, 29, 825-35.
- Kunzelmann, K., Cabrita, I., Wanitchakool, P., Ousingsawat, J., Sirianant, L., Benedetto, R. & Schreiber, R. 2016. Modulating Ca²⁺ signals: a common theme for TMEM16, Ist2, and TMC. *Pflugers Arch*, 468, 475-90.
- Kunzelmann, K., Kongsuphol, P., Aldehni, F., Tian, Y., Ousingsawat, J., Warth, R. & Schreiber, R. 2009. Bestrophin and TMEM16-Ca(2+) activated Cl(-) channels with different functions. *Cell Calcium*, 46, 233-41.
- Kunzelmann, K., Ousingsawat, J., Cabrita, I., Doušová, T., Bähr, A., Janda, M., Schreiber, R. & Benedetto, R. 2019. TMEM16A in Cystic Fibrosis: Activating or Inhibiting? *Front Pharmacol*, 10, 3.
- Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van De Peer, Y., Tavernier, J. & Callewaert, N. 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications*, 5, 4767.
- Lin, Y., Gil, C. H. & Yoder, M. C. 2017. Differentiation, Evaluation, and Application of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37, 2014-2025.
- Lisenbee, C. S., Karnik, S. K. & Trelease, R. N. 2003. Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic*, 4, 491-501.
- Liu, B., Linley, J. E., Du, X., Zhang, X., Ooi, L., Zhang, H. & Gamper, N. 2010. The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Clin Invest*, 120, 1240-52.
- Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J. & Rockberg, J. 2020. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports*, 10, 18996.
- Maniero, C., Scudieri, P., Haris Shaikh, L., Zhao, W., Gurnell, M., Galiotta, L. J. V. & Brown, M. J. 2019. ANO4 (Anoctamin 4) Is a Novel Marker of Zona Glomerulosa That Regulates Stimulated Aldosterone Secretion. *Hypertension*, 74, 1152-1159.
- Maniero, C., Zhou, J., Shaikh, L. H., Azizan, E. A., Mcfarlane, I., Neogi, S., Scudieri, P., Galiotta, L. J. & Brown, M. J. 2015. Role of ANO4 in regulation of aldosterone secretion in the zona glomerulosa of the human adrenal gland. *Lancet*, 385 Suppl 1, S62.
- Manoury, B., Tamuleviciute, A. & Tamaro, P. 2010. TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol*, 588, 2305-14.
- Marmorstein, A. D., Csaky, K. G., Baffi, J., Lam, L., Rahaal, F. & Rodriguez-Boulan, E. 2000a. Saturation of, and competition for entry into, the apical secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3248-53.
- Marmorstein, A. D., Johnson, A. A., Bachman, L. A., Andrews-Pfannkoch, C., Knudsen, T., Gilles, B. J., Hill, M., Gandhi, J. K., Marmorstein, L. Y. & Pulido, J. S. 2018. Mutant Best1 Expression and Impaired Phagocytosis in an iPSC Model of Autosomal Recessive Bestrophinopathy. *Sci Rep*, 8, 4487.
- Marmorstein, A. D., Marmorstein, L. Y., Rayborn, M., Wang, X., Hollyfield, J. G. & Petrukhin, K. 2000b. Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12758-63.

- Marquardt, A., Stöhr, H., Passmore, L. A., Krämer, F., Rivera, A. & Weber, B. H. 1998. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet*, 7, 1517-25.
- Maxfield, F. R. & Menon, A. K. 2016. Chapter 14 - Intramembrane and Intermembrane Lipid Transport. In: RIDGWAY, N. D. & MCLEOD, R. S. (eds.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*. Boston: Elsevier.
- Milenkovic, A., Brandl, C., Nachtigal, A. L., Kellner, U. & Weber, B. H. F. 2020. [Mutation-Dependent Mechanisms and Their Impact on Targeted Therapeutic Strategies with Reference to Bestrophin 1 and the Bestrophinopathies]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 237, 259-266.
- Milenkovic, A., Milenkovic, V. M., Wetzels, C. H. & Weber, B. H. F. 2018. BEST1 protein stability and degradation pathways differ between autosomal dominant Best disease and autosomal recessive bestrophinopathy accounting for the distinct retinal phenotypes. *Hum Mol Genet*, 27, 1630-1641.
- Milenkovic, V. M., Röhrle, E., Weber, B. H. & Strauss, O. 2011. Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. *J Cell Sci*, 124, 2988-96.
- Nachtigal, A. L., Milenkovic, A., Brandl, C., Schulz, H. L., Duerr, L. M. J., Lang, G. E., Reiff, C., Herrmann, P., Kellner, U. & Weber, B. H. F. 2020. Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. *Int J Mol Sci*, 21.
- Naslavsky, N. & Caplan, S. 2018. The enigmatic endosome - sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci*, 131.
- Neussert, R., Müller, C., Milenkovic, V. M. & Strauss, O. 2010. The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER. *Pflugers Arch*, 460, 163-75.
- Nordström, S. 1974. Hereditary macular degeneration--a population survey in the country of Vsterbotten, Sweden. *Hereditas*, 78, 41-62.
- Okkenhaug, H., Weylandt, K. H., Carmenta, D., Wells, D. J., Higgins, C. F. & Sardini, A. 2006. The human CIC-4 protein, a member of the CLC chloride channel/transporter family, is localized to the endoplasmic reticulum by its N-terminus. *Faseb j*, 20, 2390-2.
- Ousingsawat, J., Martins, J. R., Schreiber, R., Rock, J. R., Harfe, B. D. & Kunzelmann, K. 2009. Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport. *J Biol Chem*, 284, 28698-703.
- Park, R. 2023. HEK cells – what's to know on Human Embryonic Kidney Cells [Online]. <https://www.evitria.com/journal/cho-cells/hek-cells/>: evitria. Available: <https://www.evitria.com/journal/cho-cells/hek-cells/> [Accessed 02.09.2023 2023].
- Pedemonte, N. & Galletta, L. J. 2014. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol Rev*, 94, 419-59.
- Petrukhin, K., Koisti, M. J., Bakall, B., Li, W., Xie, G., Marknell, T., Sandgren, O., Forsman, K., Holmgren, G., Andreasson, S., Vujic, M., Bergen, A. A., McGarty-Dugan, V., Figueroa, D., Austin, C. P., Metzker, M. L., Caskey, C. T. & Wadelius, C. 1998. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet*, 19, 241-7.
- Piccolo, A., Malvezzi, M. & Accardi, A. 2015. TMEM16 proteins: unknown structure and confusing functions. *J Mol Biol*, 427, 94-105.
- Pifferi, S., Cenedese, V. & Menini, A. 2012. Anoctamin 2/TMEM16B: a calcium-activated chloride channel in olfactory transduction. *Exp Physiol*, 97, 193-9.
- Priori, S. G., Blomström-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Blom, N., Borggrefe, M., Camm, J., Elliott, P. M., Fitzsimons, D., Hatala, R., Hindricks, G., Kirchhof, P., Kjeldsen, K., Kuck, K.-H., Hernandez-Madrid, A., Nikolaou, N., Norekvål, T. M., Spaulding, C., Van Veldhuisen, D. J. & Group, E. S. D. 2015. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *European Heart Journal*, 36, 2793-2867.
- Raga, S., Specchio, N., Rheims, S. & Wilmshurst, J. M. 2021. Developmental and epileptic encephalopathies: recognition and approaches to care. *Epileptic Disord*, 23, 40-52.

- Reichhart, N., Milenkovic, V. M., Halsband, C. A., Cordeiro, S. & Strauss, O. 2010. Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit. *Exp Eye Res*, 91, 630-9.
- Reichhart, N., Milenkovic, V. M., Wetzel, C. H. & Strauß, O. 2021. Prediction of Functional Consequences of Missense Mutations in ANO4 Gene. *Int J Mol Sci*, 22.
- Reichhart, N., Schöberl, S., Keckeis, S., Alfaar, A. S., Roubex, C., Cordes, M., Crespo-Garcia, S., Haeckel, A., Kociok, N., Föckler, R., Fels, G., Mataruga, A., Rauh, R., Milenkovic, V. M., Zühlke, K., Klussmann, E., Schellenberger, E. & Strauß, O. 2019. Anoctamin-4 is a bona fide Ca(2+)-dependent non-selective cation channel. *Sci Rep*, 9, 2257.
- Renner, A. B., Tillack, H., Kraus, H., Krämer, F., Mohr, N., Weber, B. H., Foerster, M. H. & Kellner, U. 2005. Late onset is common in best macular dystrophy associated with VMD2 gene mutations. *Ophthalmology*, 112, 586-92.
- Rock, J. R., O'neal, W. K., Gabriel, S. E., Randell, S. H., Harfe, B. D., Boucher, R. C. & Grubb, B. R. 2009. Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways. *J Biol Chem*, 284, 14875-80.
- Rosenthal, R., Bakall, B., Kinnick, T., Peachey, N., Wimmers, S., Wadelius, C., Marmorstein, A. & Strauss, O. 2006. Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *Faseb j*, 20, 178-80.
- Saftig, P. & Klumperman, J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 623-35.
- Sagheddu, C., Boccaccio, A., Dibattista, M., Montani, G., Tirindelli, R. & Menini, A. 2010. Calcium concentration jumps reveal dynamic ion selectivity of calcium-activated chloride currents in mouse olfactory sensory neurons and TMEM16b-transfected HEK 293T cells. *J Physiol*, 588, 4189-204.
- Scheffer, I. E. & Nabbout, R. 2019. SCN1A-related phenotypes: Epilepsy and beyond. *Epilepsia*, 60 Suppl 3, S17-s24.
- Schreiber, R., Uliyakina, I., Kongsuphol, P., Warth, R., Mirza, M., Martins, J. R. & Kunzelmann, K. 2010. Expression and function of epithelial anoctamins. *J Biol Chem*, 285, 7838-45.
- Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. 2008. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*, 134, 1019-29.
- Sherva, R., Tripodis, Y., Bennett, D. A., Chibnik, L. B., Crane, P. K., De Jager, P. L., Farrer, L. A., Saykin, A. J., Shulman, J. M., Naj, A. & Green, R. C. 2014. Genome-wide association study of the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 10, 45-52.
- Silva, A. M. S., Coimbra-Neto, A. R., Souza, P. V. S., Winckler, P. B., Gonçalves, M. V. M., Cavalcanti, E. B. U., Carvalho, A., Sobreira, C., Camelo, C. G., Mendonça, R. D. H., Estephan, E. D. P., Reed, U. C., Machado-Costa, M. C., Dourado-Junior, M. E. T., Pereira, V. C., Cruzeiro, M. M., Helito, P. V. P., Aivazoglou, L. U., Camargo, L. V. D., Gomes, H. H., Camargo, A., Pinto, W., Badia, B. M. L., Libardi, L. H., Yanagiura, M. T., Oliveira, A. S. B., Nucci, A., Saute, J. a. M., França-Junior, M. C. & Zanoteli, E. 2019. Clinical and molecular findings in a cohort of ANO5-related myopathy. *Ann Clin Transl Neurol*, 6, 1225-1238.
- Silva, F., Padín-Iruegas, M. E., Caponio, V. C. A., Lorenzo-Pouso, A. I., Saavedra-Nieves, P., Chamorro-Petronacci, C. M., Suárez-Peñaranda, J. & Pérez-Sayáns, M. 2022. Caspase 3 and Cleaved Caspase 3 Expression in Tumorigenesis and Its Correlations with Prognosis in Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*, 23.
- Singh, R., Kuai, D., Guziewicz, K. E., Meyer, J., Wilson, M., Lu, J., Smith, M., Clark, E., Verhoeven, A., Aguirre, G. D. & Gamm, D. M. 2015. Pharmacological Modulation of Photoreceptor Outer Segment Degradation in a Human iPS Cell Model of Inherited Macular Degeneration. *Mol Ther*, 23, 1700-1711.
- Singh, R., Phillips, M. J., Kuai, D., Meyer, J., Martin, J. M., Smith, M. A., Perez, E. T., Shen, W., Wallace, K. A., Capowski, E. E., Wright, L. S. & Gamm, D. M. 2013a. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54, 6767-78.
- Singh, R., Shen, W., Kuai, D., Martin, J. M., Guo, X., Smith, M. A., Perez, E. T., Phillips, M. J., Simonett, J. M., Wallace, K. A., Verhoeven, A. D., Capowski, E. E., Zhang, X., Yin, Y., Halbach, P. J., Fishman, G.

- A., Wright, L. S., Pattnaik, B. R. & Gamm, D. M. 2013b. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet*, 22, 593-607.
- Stepanenko, A. A. & Dmitrenko, V. V. 2015. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569, 182-90.
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H. & Nagata, S. 2013. Calcium-dependent Phospholipid Scramblase Activity of TMEM16 Protein Family Members*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 13305-13316.
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J. & Nagata, S. 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468, 834-8.
- Terracciano, A., Sanna, S., Uda, M., Deiana, B., Usala, G., Busonero, F., Maschio, A., Scally, M., Patriciu, N., Chen, W. M., Distel, M. A., Slagboom, E. P., Boomsma, D. I., Villafuerte, S., Sliwerska, E., Burmeister, M., Amin, N., Janssens, A. C., Van Duijn, C. M., Schlessinger, D., Abecasis, G. R. & Costa, P. T., Jr. 2010. Genome-wide association scan for five major dimensions of personality. *Mol Psychiatry*, 15, 647-56.
- Thomas-Gatewood, C., Neeb, Z. P., Bulley, S., Adebisi, A., Bannister, J. P., Leo, M. D. & Jaggar, J. H. 2011. TMEM16A channels generate Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H1819-27.
- Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., Zhao, Y., Harris, D. C. & Zheng, G. 2011. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 567305.
- Tian, Y., Schreiber, R. & Kunzelmann, K. 2012. Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Cell Sci*, 125, 4991-8.
- Uggenti, C., Briant, K., Streit, A. K., Thomson, S., Koay, Y. H., Baines, R. A., Swanton, E. & Manson, F. D. 2016. Restoration of mutant bestrophin-1 expression, localisation and function in a polarised epithelial cell model. *Dis Model Mech*, 9, 1317-1328.
- Webb, B. T., Guo, A. Y., Maher, B. S., Zhao, Z., Van Den Oord, E. J., Kendler, K. S., Riley, B. P., Gillespie, N. A., Prescott, C. A., Middeldorp, C. M., Willemsen, G., De Geus, E. J., Hottenga, J. J., Boomsma, D. I., Slagboom, E. P., Wray, N. R., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Wright, M. J., Heath, A. C., Madden, P. A., Gelernter, J., Knowles, J. A., Hamilton, S. P., Weissman, M. M., Fyer, A. J., Huezodia, P., McGuffin, P., Farmer, A., Craig, I. W., Lewis, C., Sham, P., Crowe, R. R., Flint, J. & Hottenga, J. M. 2012. Meta-analyses of genome-wide linkage scans of anxiety-related phenotypes. *Eur J Hum Genet*, 20, 1078-84.
- Wilde, A. a. M. & Amin, A. S. 2018. Clinical Spectrum of SCN5A Mutations: Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Cardiomyopathy. *JACC Clin Electrophysiol*, 4, 569-579.
- Wittkowski, K. M., Dadurian, C., Seybold, M. P., Kim, H. S., Hoshino, A. & Lyden, D. 2018. Complex polymorphisms in endocytosis genes suggest alpha-cyclodextrin as a treatment for breast cancer. *PLoS One*, 13, e0199012.
- Yang, F., Begemann, A., Reichhart, N., Haeckel, A., Steindl, K., Schellenberger, E., Sturm, R. F., Barth, M., Bassani, S., Courtin, T., Delobel, B., Gunning, B., Prouteau, C., Linnankivi, T., Tölle, S., Verbeek, N., Ziegler, A., Zweier, M., Horn, A., Sticht, H., Weckhuysen, S., Strauss, O. & Rauch, A. eingereicht. ANO4 is a novel gene causing developmental and epileptic encephalopathy or GEFS+ and temporal lobe epilepsy. *American Journal of Human Genetics*. (Publikation wurde eingereicht und Anfang 2024 akzeptiert)
- Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B. M., Raouf, R., Shin, Y. K. & Oh, U. 2008. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*, 455, 1210-5.
- Yu, K., Xiao, Q., Cui, G., Lee, A. & Hartzell, H. C. 2008. The best disease-linked Cl⁻ channel hBest1 regulates Ca^v1 (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains. *J Neurosci*, 28, 5660-70.
- Zhu, Y., Carido, M., Meinhardt, A., Kurth, T., Karl, M. O., Ader, M. & Tanaka, E. M. 2013. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One*, 8, e54552.

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ronja Fini Sturm, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Channelopathies – zelluläres Verhalten mutanter Proteine am Beispiel von Anoctamin-4 und Bestrophin-1“ („Channelopathies – subcellular localisation of mutant proteins taking anoctamin-4 und bestrophin-1 as examples“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

12. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei allen Personen, die mich während meiner Zeit im Labor und während der Erstellung meiner Dissertationsschrift unterstützt haben.

Ich danke meinem Erstbetreuer und Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß für die engagierte, zuverlässige und umfassende Betreuung. Vielen Dank vor allem für die Unterstützung bei der Ausarbeitung des Konzepts für meine Experimente, für die hilfreichen Tipps und Ideen zur Optimierung der Protokolle insbesondere als Reaktion auf nicht funktionierende Immunzytochemie-Experimente. Vielen Dank für das schnelle Beantworten all meiner Fragen und die zuverlässige Erreichbarkeit, auch bei der Niederschrift dieser Dissertationsarbeit.

Ein großer Dank gilt ebenfalls meiner Betreuerin Frau Dr. med. Nadine Reichhart für die Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor und die praktischen Tipps während der Umsetzung der Experimente. Auch die fortdauernde Erreichbarkeit für wichtige Rückfragen, nachdem Frau Reichhart das Institut verlassen hat, schätze ich sehr. Besonders Danken möchte ich Herrn Olaf Strauß und Frau Nadine Reichhart für die gute Organisation und Zusammenarbeit, sodass ich trotz großer organisatorischer Umstellungen durch das Verlassen von Nadine Reichhart des Instituts durchweg zuverlässige Ansprechpartner und Unterstützung hatte.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mit-Doktoranden/-Doktorandinnen und PhD-Studierenden (Fang Yang, Andjela Sekulic, Inga-Marie Pompös, Alissa Schäfer, Piotr Bucichowski, Lucas Stützbecher, Sára Docekalová, Louise Partzsch, Ricarda Kresse) und anderen Mitarbeitenden des Labors (Norbert Kociok und Sergej Skosyrski) bedanken für die gemeinsame Arbeit im Labor und für die gegenseitige praktische und mentale Unterstützung, wodurch das Labor nicht nur ein Ort des Arbeitens, sondern auch ein Ort des Austauschs und der gegenseitigen Unterstützung ist. Ein besonderer Dank gilt hierbei Piotr Bucichowski und Fang Yang – Mit Piotr Bucichowski habe ich gemeinsam die Immunzytochemie der iPS-RPE-Zellen angefertigt und wurde durch ihn geduldig in das Mikroskopieren der iPS-RPE-Zellen eingeführt (das Mikroskopieren des Samples A erfolgte durch Piotr Bucichowski, das Mikroskopieren des Samples B konnte ich dann allein bewerkstelligen). Von Fang Yang habe ich insbesondere hilfreiche Unterstützung und Tipps für die Kultivierung der HEK293-Zellen erfahren.

14. Bescheinigung zur Statistikberatung



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie

Name, Vorname:

Sturm, Ronja Fini

Emailadresse:

ronja-fini.sturm@charite.de

Matrikelnummer:

220844

Promotionsbetreuer*in:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß

Promotionsinstitution:

Institut für experimentelle Ophthalmologie

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschke

Postanschrift:

Charitéplatz 1 | 10117 Berlin

Besucher*innenanschrift:

Sauerbruchweg 3 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171

<https://biometrie.charite.de>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass *Ronja Sturm* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben in Anspruch genommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- 25.04.2022
- 12.05.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Notwendigkeit eines Outlier Tests diskutiert
- Voraussetzungen für (ungepaarte) t -Tests besprochen
- Normalverteilung der Daten und mögliche Transformationen (z.B. Arcsin-Wurzel) besprochen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das iBike übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 15. Oktober 2023

 Lukas Moedl
2023.10.15 00:07:24
+02'00'

Unterschrift Berater*in