

Aus dem Institut für Experimentelle Ophthalmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Interaktionen zwischen Bestrophin-1 und der GTPase Rab27a: Effekte
krankheitsbedingender Mutationen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Talitha Sophia Schorb

aus Mannheim

Datum der Promotion: 14.09.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungen	6
Zusammenfassung	8
Abstract	10
1. Einleitung.....	12
1.1 Die Retina.....	12
1.2 Aufbau und Funktionen des retinalen Pigmentepithels	12
1.3 Bestrophin-1 und Best'sche vitelliforme Makuladystrophie.....	14
1.3.1 Best'sche vitelliforme Makuladystrophie.....	14
1.3.2 Bestrophin-1	16
1.3.3 Pathogenese der BVMD	20
1.4 Rab27a.....	22
1.5 Fragestellung.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Geräte	27
2.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.3 Chemikalien.....	28
2.4 Zelllinien und Bakterienstämme	28
2.5 Antikörper	28
2.5.1 Primäre Antikörper für Western Blot und Immunzytochemie	28
2.5.2 Sekundäre Antikörper für Western Blot	29
2.5.3 Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie.....	29
2.6 Käuflich erworbene Plasmide	29
2.7 Primer.....	29
2.8 Enzyme und Kits.....	29
2.9 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen	30
2.9.1 Käuflich erworbene Medien und Medienzusätze	30
2.9.2 Rezepte	30
2.9.2.1 Klonierung.....	30
2.9.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	31
2.9.2.3 Koimmunpräzipitation.....	31
2.9.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	31
2.9.2.5 Immunzytochemie	32
2.10 Plasmide und Klonierung	32
2.10.1 Verwendete Plasmide	32
2.10.2 Verwendete Primer	32

2.10.3	Vervielfältigung von Plasmid-DNA	33
2.10.4	PCR-gesteuerte Mutagenese.....	33
2.10.4.1	Allgemeine Vorgehensweise	33
2.10.4.2	PCR	33
2.10.4.3	Ligation zweier DNA-Fragmente	34
2.10.4.4	Ligation in den Vektor	35
2.10.5	Kompetente Bakterien und Transformation.....	35
2.10.6	Identifizierung der richtigen Kolonien	36
2.10.6.1	Selektion durch Antibiotikaresistenz.....	36
2.10.6.2	Blau-weiß-Selektion	36
2.10.7	Sequenzierung.....	37
2.10.8	Umgang mit kompetenten Zellen und Aufbewahrung der Klone.....	37
2.10.9	Isolation rekombinanter Plasmid-DNA aus Bakterien	37
2.10.9.1	Minipräparationen	37
2.10.9.2	Maxipräparationen	37
2.10.10	Restriktionsverdau	38
2.10.11	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	39
2.10.11.1	DNA-Isolierung aus Gelen	39
2.11	Zellkultur und Transfektionen.....	41
2.11.1	Allgemeines	41
2.11.2	Zellkultur und Passagieren von Zellen	41
2.11.2.1	Transfektion	41
2.12	Koimmunpräzipitation	42
2.12.1	Allgemeines Funktionsprinzip	42
2.12.2	Aufbereitung der Zelllysate	43
2.12.3	SDS-PAGE	44
2.12.3.1	Theoretische Grundlagen.....	44
2.12.3.2	Durchführung der Gelelektrophorese	44
2.12.4	Western Blot	45
2.13	Immunzytochemie.....	45
2.14	Auswertung der Daten und statistische Analyse	46
3.	Ergebnisse	48
3.1	Kontrollversuche.....	48
3.1.1	Endogene Expression und Antikörperspezifität	48
3.1.2	Immunpräzipitationskontrollen	49
3.1.2.1	Protokolle und Präzipitationseffizienz	49
3.1.2.2	Artefakte der Koimmunpräzipitation.....	50

3.1.3	Kontrollen für zelluläre Immunhistochemie.....	50
3.2	Rab27a und Bestrophin-1-Wt interagieren.....	51
3.3	Abgeschwächte Interaktion zwischen Rab27a und krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten	53
3.3.1	Simulation autosomal-dominant-negativer Effekte: Tripletransfektionen	58
3.4	Suche nach einer Interaktionsdomäne zwischen Rab27a und Bestrophin-1	60
3.4.1	Mutanten.....	60
3.4.2	Ergebnisse der Suche nach einer Interaktionsdomäne	61
4.	Diskussion	66
4.1	Limitationen der Methoden	66
4.1.1	Limitationen der Koimmunpräzipitation	66
4.1.2	Limitationen der Immunzytochemie.....	67
4.1.3	Übertragbarkeit auf humanes RPE	68
4.1.4	Validität der erhobenen Daten	70
4.2	Suche nach einer Interaktionsdomäne.....	71
4.2.1	Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen mit Bestrophin-1-Deletionsmutanten.....	71
4.2.2	Ergebnisse der Immunzytochemie zur Untersuchung der Deletionsmutanten.....	74
4.2.3	Bindungsbereich und Art der Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1.....	76
4.3	Untersuchung krankheitsrelevanter Mutanten.....	79
4.3.1	Bestrophin-1/Rab27a-Interaktion bei Koexpression von Bestrophin-1-Wt und Bestrophin-1-Mutanten	82
4.4	Fazit und mögliche Rolle von Rab27a in der Pathogenese der BVMD.....	85
4.5	Weiterer Forschungsbedarf	88
	Literaturverzeichnis.....	90
	Eidesstattliche Versicherung.....	99
	Curriculum Vitae	100
	Publikationen	101
	Danksagung	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Anatomie des menschlichen Auges und der Retina.....	12
Abb. 1.2	Zusammenfassung der Funktionen des RPE	14
Abb. 1.3	Verschiedene ophthalmoskopische Befunde bei Morbus Best.....	16
Abb. 1.4	Topologische Modelle für Bestrophin-1	19
Abb. 1.5	Der Rab-Zyklus	23
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der Rab27-Effektoren	24
Abb. 2.1	Flussdiagramme zur Vorgehensweise bei Klonierungen	40
Abb. 3.1	Expressionssystemkontrollen	48
Abb. 3.2	Etablierung der Immunpräzipitationsprotokolle	49
Abb. 3.3	Färbung von Integrin zur Visualisierung der Zellmembranen	51
Abb. 3.4	Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1-Wt	52
Abb. 3.5	Subzelluläre Lokalisation von Rab27a und Bestrophin-1-Wt	53
Abb. 3.6	Interaktion zwischen Rab27a und krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten	54
Abb. 3.7	Subzelluläre Lokalisation von Rab27a und krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten	56
Abb. 3.8	Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1 bei Imitation eines autosomal- dominanten Erbgangs.....	59
Abb. 3.9	Verwendete Bestrophin-1-Deletionsmutanten	61
Abb. 3.10	Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1-Deletionsmutanten zur Bestimmung der Interaktionsdomäne.....	62
Abb. 3.11	Subzelluläre Lokalisation von Rab27a und Bestrophin-1-Deletionsmutanten	64
Abb. 4.1	Proteinnachweis im RPE	68
Abb. 4.2	Unterschiedliche Bandenintensität je nach verwendetem Bestrophin-1-Plasmid ..	73
Abb. 4.3	Mutations-Hotspots für Bestrophin-1	79
Abb. 4.4	Intrazelluläre Stationen von Bestrophin-1	86

Abkürzungen

AK	Antikörper
ARB	Autosomal-rezessive Bestrophinopathie
Arg	Arginin
BEST1	Bestrophin-1-Gen
Bestrophin-1-Wt	Bestrophin-1-Wildtyp
BSA	Bovines Serumalbumin
BVMD	Best'sche vitelliforme Makuladystrophie, Morbus Best
CaCC	Ca ²⁺ -aktivierte Cl ⁻ -Kanal
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
D	Asparaginsäure, Asp
E	Glutaminsäure, Glu
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ENaC	Epithelialer Na ⁺ -Kanal
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase accelerating protein, GTPase-aktivierende Proteine
GDI	GDP dissociation inhibitor, GDP-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin nucleotide exchange factor, GTP-Austauschfaktor
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Meerrettichperoxidase
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
IP	Immunpräzipitat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
L	Lysat
Lep H1	<i>Escherichia coli</i> leader peptidase H1
LP	Light peak, Hellanstieg
<i>mBest1</i>	Bestrophin-1-Gen der Maus
Munc13-4	Mammalian uncoordinated
MV	Mikrovilli

NB	Not bound, nicht gebundene Fraktion
NK	Negativkontrolle
Noc2	No C2 domain protein
OS	Photorezeptoraußensegment
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCC	Pearson's correlation coefficient, Pearson-Korrelationskoeffizient
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
Phe	Phenylalanin
PIC	Phenylisocyanat
PK	Positivkontrolle
Pro	Prolin
R27BD	Rab27-Bindungsdomänen
RabGGT	Rab-Geranylgeranyltransferase
REP	Rab Escort Protein
RPE	Retinales Pigmentepithel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SHD	Slp homology domains
Slac2	Slp-lacking C2 domains
Slp	Synaptotagmin-like proteins
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophorese-Puffer
TMD	Transmembrandomäne
Val	Valin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
XGAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Zusammenfassung

Mutationen im BEST1 rufen eine Reihe retinaler Erkrankungen hervor, darunter die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD). Das Genprodukt von BEST1 ist Bestrophin-1, welches größtenteils in der basolateralen Membran des retinalen Pigmentepithels (RPE) zu finden ist. Es handelt sich hierbei um einen pentamerischen Anionenkanal, der zudem als Regulator der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie anderer Ionenkanäle fungiert. Da die physiologische Funktion nicht abschließend geklärt ist, sind auch die Pathomechanismen der BVMD bislang unklar. Ein krankheitsverursachendes Phänomen besteht im Versagen des intrazellulären Traffickings mutanter Bestrophine, welche ihre basolaterale Lokalisation verloren haben. Es bestehen Hinweise auf eine mögliche Interaktion von Bestrophin-1 mit der kleinen GTPase Rab27a, die an intrazellulären Transportprozessen beteiligt ist.

In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob eine solche Wechselwirkung existiert und welche Mechanismen ihr gegebenenfalls zugrunde liegen.

Zu diesem Zweck wurden mithilfe transfizierter CHO-Zellen Koimmunpräzipitationen zwischen Rab27a und wildtypischem Bestrophin-1 sowie verschiedenen mutanten Formen durchgeführt, darunter vier bekannte BVMD-assoziierte Mutanten (T6P, F80L, R218C, F305S). Weitere Mutanten, zum Teil eigens dafür hergestellt, denen strategisch einzelne Bereiche der Aminosäuresequenz fehlten, wurden gezielt für die Suche nach einer Bindungsdomäne eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Koimmunpräzipitation in allen Experimenten stattfand, diese war jedoch bei zwei der natürlich vorkommenden Mutanten (T6P, F305S) deutlich eingeschränkt. Zusätzlich wurden die Proteine in vivo in transfizierten CHO-Zellen immunzytochemisch untersucht. Bei allen mutanten Bestrophinen war die intrazelluläre Verteilung und Kolo-kalisation mit Rab27a im Vergleich zum Bestrophin-1-Wildtyp beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Bestrophin-1 und Rab27a tatsächlich interagieren. Es gelang bisher nicht, eine Interaktionsdomäne zu bestimmen. Jedoch konnten zwei vielversprechende Bereiche identifiziert werden, die in Zukunft näher untersucht werden sollten. Da diese auch die Ca^{2+} -Bindung des Bestrophin-1 vermitteln, erscheint ein Einfluss von Ca^{2+} auf die Interaktion wahrscheinlich. Eine Beteiligung weiterer vermittelnder Interaktionspartner ist möglich. In der Pathogenese der BVMD könnte Rab27a bei einigen Mutationen eine Rolle spielen, etwa indem durch eine

eingeschränkte Interaktion der subzelluläre Transport oder die Kanaleigenschaften des Bestrophin-1 beeinträchtigt oder Phagozytoseprozesse im RPE beeinflusst werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei verschiedenen ursächlichen Mutationen unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zum Tragen kommen. Rab27a ist vermutlich nur bei einigen beteiligt und auch in diesen Fällen nicht alleine für die typische Symptomatik verantwortlich.

Abstract

Mutations in BEST1 result in several different retinal degenerative diseases, amongst them Best macular dystrophy. The gene product of BEST1 is bestrophin-1, which can mostly be found at the basolateral side of the retinal pigment epithelium (RPE). Bestrophin-1 is a pentameric anion channel which also appears to function as a regulator of the intracellular Ca^{2+} concentration as well as a modulator of other ion channels. Since the physiological function of bestrophin-1 is not yet fully discovered, pathomechanisms of Best disease are still largely unknown. One pathogenic mechanism seems to involve failure of intracellular trafficking of mutant bestrophin-1 resulting in loss of basolateral localization. There are hints of a possible interaction of bestrophin-1 with Rab27a, a small GTPase involved in intracellular transport mechanisms.

This study aims to detect whether there is such an interaction and on which mechanisms this interaction is based.

Therefore, co-immunoprecipitation between Rab27a and both bestrophin-1 wildtype and several mutant forms transfected into CHO cells was performed, some of the mutants being associated with Best disease (T6P, F80L, R218C, F305S). Other mutants, strategically missing parts of the amino acid sequence – some of which were specially created for this purpose – were used to determine a possible binding domain. It could be demonstrated that there is co-immunoprecipitation taking place in all the experiments, though clearly attenuated in two of the naturally occurring mutants (T6P, F305S). Additionally, immunocytochemical stainings were employed to further investigate the proteins in vivo in transfected CHO cells. All mutant forms were shown to be mislocalized and to exhibit reduced co-localization with Rab27a compared to bestrophin-1 wildtype.

These results show that there clearly is some kind of interaction taking place. So far, no interaction domain could be identified. However, it was possible to determine two highly promising domains which should be further investigated. These domains mediate bestrophin-1 binding to Ca^{2+} , making it probable that bestrophin-1/Rab27a interaction is Ca^{2+} -dependent. Other interposed interaction partners might mediate the binding. In the pathogenesis of Best disease, Rab27a could possibly play a role, a reduced interaction for instance leading to impaired subcellular transport or altered ion channel properties of bestrophin-1 or playing a part in phagocytic processes in the RPE. The results indicate that for different disease-causing mutations, distinct pathomechanisms come into effect.

Only for some of them Rab27a seems to be of importance, although even then it is probably not responsible for all of the typical symptoms of Best disease.

1. Einleitung

1.1 Die Retina

Die Retina ist die sensorische Gewebsschicht am Augenhintergrund, in der Licht wahrgenommen und in Nervenimpulse umgesetzt wird. Sie setzt sich aus mehreren, eng miteinander interagierenden Zellschichten zusammen (Abb. 1.1). Die eigentlich lichtsensitiven Zellen, die Zapfen und Stäbchen, befinden sich auf der dem Licht abgewandten Seite, eingebettet in das retinale Pigmentepithel (RPE). Verschiedene Arten von Interneuronen (Amakrinzellen, bipolare Zellen und Horizontalzellen) verschalten diese Photorezeptoren untereinander und dienen der ersten Verarbeitung der elektrischen Signale. In Form von Aktionspotentialen wird schließlich die visuelle Information über Ganglienzellen an den visuellen Cortex weitergeleitet (Masland, 2012).

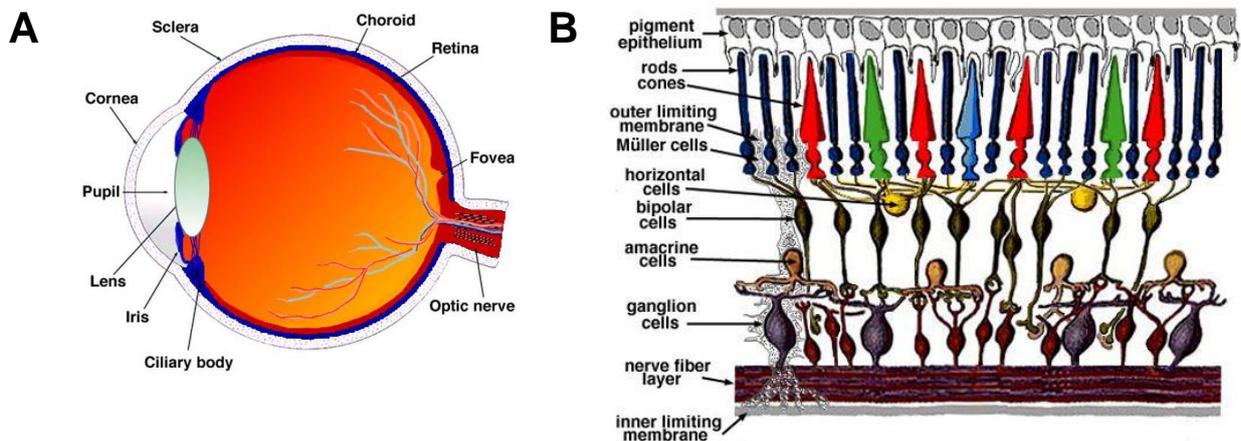


Abb. 1.1: Anatomie des menschlichen Auges und der Retina. A: Visualisierung der wichtigsten Strukturen des Auges in einem sagittalen Schnittbild. Quelle: Kolb, 2012 B: Vereinfachte Darstellung der retinalen Zellen und Schichten. Quelle: Kolb, 2011

1.2 Aufbau und Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Das RPE ist ein einschichtiges, polarisiertes Epithel, das die Retina begrenzt und von der Chorioidea trennt. Mit zahlreichen wichtigen Funktionen trägt es wesentlich zur Aufrechterhaltung der Sehfähigkeit des Auges bei (Abb. 1.2).

Apikal umgreift das RPE mit mikrovillären Fortsätzen die Photorezeptoraußensegmente, mit denen es eine enge funktionelle Einheit formt. Die basolaterale Membran des RPE bildet zusammen mit der Bruch'schen Membran die äußere Blut-Retina-Schranke. Tight-junctions definieren das RPE als dichtes Epithel, sodass nur ein selektiver,

kontrollierter Stoffaustausch zwischen dem subretinalen Raum beziehungsweise den Photorezeptoren und dem Blut auf der transzellulären Route stattfinden kann. Einerseits werden so Stoffwechselendprodukte der Retina entfernt, andererseits erfolgt die Nährstoffversorgung der Photorezeptoren über diesen Weg. Bedingt durch die hohe Stoffwechselaktivität der Neuronen und Photorezeptoren der Retina und den Augeninnendruck fallen im subretinalen Raum außerdem erhebliche Mengen an metabolischem Wasser an, die in das Blut abtransportiert werden müssen. Das RPE dient deshalb auch dem Wasser- und Ionentransport. Über mehrere Mechanismen stellt das RPE die fortbestehende Erregbarkeit der Photorezeptoren sicher. Ein stabiler Ionenhaushalt spielt dabei eine wichtige Rolle, um die korrekte Signalübertragung durch Hyperpolarisation der im Dunkeln depolarisierten Photorezeptorzelle zu gewährleisten. Mit dieser Hyperpolarisation geht die Verminderung des Dunkelstroms im Photorezeptor einher, wodurch die K^+ -Konzentration im subretinalen Raum von 5 auf 2 mM sinkt. Das RPE kompensiert diese Schwankungen in der subretinalen K^+ -Konzentration durch den Aus- oder Einstrom von K^+ durch die apikale Membran. Diese Kompensationsleistung lässt sich im Elektroretinogramm (ERG) als c-Welle messen, deren Amplitude in der Größenordnung derer liegt, die die neuronale Aktivität repräsentieren. Entscheidend ist auch die kontinuierliche Reisoomerisierung von 11-cis-Retinal im Sehzyklus. Absorbiert ein Rhodopsin-Molekül im Photorezeptor ein Photon, entsteht bei der Umwandlung des Lichtreizes in ein elektrochemisches Signal die isomere Form all-trans-Retinal, die das Photochrom des Rhodopsins darstellt. Das Rhodopsin kann erst nach der Regeneration des all-trans-Retinals in 11-cis-Retinal wieder erregt werden, ein Prozess, der im RPE stattfindet. Da sie einer hohen photooxidativen Belastung ausgesetzt sind, müssen die Außensegmente der Photorezeptoren ständig erneuert werden. Abgestoßene Photorezeptoraußensegmente werden anschließend durch das RPE phagozytiert. Die Zellen des RPE sind melaninhaltig und deshalb dunkel pigmentiert. Dies dient unter anderem der Verminderung von Streulicht zur Verbesserung der optischen Qualität, da bei intensivem Lichteinfall Lichtenergie absorbiert werden kann. Nicht zuletzt hat das RPE eine sekretorische Funktion. Es ist in der Lage, verschiedene Wachstumsfaktoren zu sezernieren. Durch die Sekretion immunsuppressiver Faktoren hilft es zudem beim Aufbau des Immunprivilegs des Auges und bildet damit auch eine aktive Barriere (Sparrow *et al.*, 2010; Strauss, 2005).

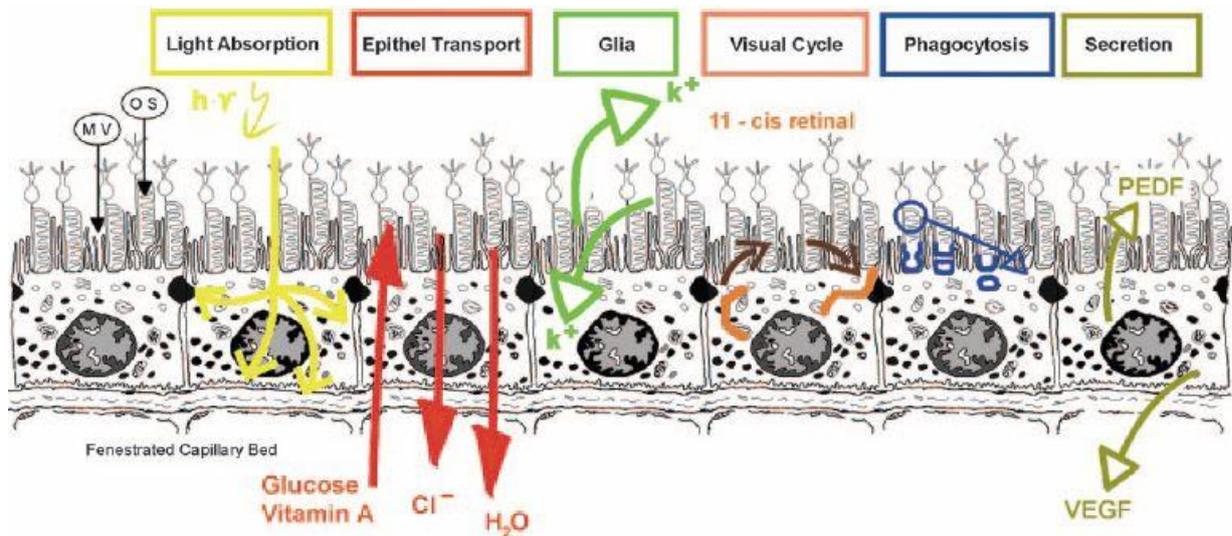


Abb. 1.2: Zusammenfassung der Funktionen des RPE. (MV = Mikrovilli, OS = Außensegment, PEDF = pigment epithelium-derived growth factor, VEGF = vascular endothelial growth factor). Quelle: Strauss, 2005

Eine Störung jeder einzelnen Komponente kann zu Verlust der vollständigen Funktionsfähigkeit des Auges und retinaler Degeneration führen.

1.3 Bestrophin-1 und Best'sche vitelliforme Makuladystrophie

1.3.1 Best'sche vitelliforme Makuladystrophie

Die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD, Morbus Best) ist eine autosomal-dominant vererbte juvenile Makuladystrophie, die 1905 erstmalig durch den deutschen Ophthalmologen Friedrich Best beschrieben wurde (Best, 1905). Die Ursache der Erkrankung liegt in einer Mutation des BEST1-Gens (vorher VMD2-Gen) auf Chromosom 11q12-q13.1 (Marquardt *et al.*, 1998). Derzeit sind über 140 verschiedene krankheitsverursachende Mutationen dokumentiert, wobei es sich in den meisten Fällen um Missense-Mutationen in der N-terminalen Hälfte des Proteins handelt. Einen Überblick über diese Mutationen kann man sich mithilfe der BEST1 Datenbank der Universität Regensburg verschaffen (http://www-huge.uni-regensburg.de/BEST1_database/). Die genaue Prävalenz von Morbus Best ist nicht bekannt. Es gibt eine Schätzung aus Nordschweden aus dem Jahr 1974, die eine Prävalenz von 1 : 5.000 annimmt, in Dänemark wurde sie 2012 auf 1 : 67.000 geschätzt. Eine Analyse der Patientendaten aus Olmsted County, Minnesota aus den Jahren 2000 bis 2014 ergab dort eine Häufigkeit von 1 : 16.500 bis 1 : 21.000 (Bitner *et al.*, 2012; Dalvin *et al.*, 2017;

Nordström, 1974). Da es sich um eine seltene Erkrankung handelt, welche aufgrund ihrer Seltenheit häufig nicht oder erst spät erkannt werden, ist allerdings anzunehmen, dass die echte Prävalenz höher ist, als die bekannten Patientendaten suggerieren.

Die meisten BVMD-Patienten leiden vorrangig unter einer fortschreitenden Visusminderung im Bereich des schärfsten Sehens bis hin zu einem zentralen Gesichtsfeldausfall. Es können ein oder beide Augen betroffen sein. Weitere mögliche Symptome sind außerdem verstärkte Lichtempfindlichkeit, Nachtblindheit und Metamorphopsien. Zu einer vollständigen Erblindung kommt es in der Regel nicht. Im Elektrokulogramm (EOG) weisen Betroffene typischerweise einen verminderten bis fehlenden Hellanstieg (Light peak, LP) auf. Ophthalmoskopisch zeigen sich Makulaläsionen mit Ablagerungen eines gelblichen Materials, wobei es sich vermutlich um Lipofuszinablagerungen handelt (Boon *et al.*, 2009; O’Gorman *et al.*, 1988). Lipofuszin ist ein unlösliches, gelb-braun pigmentiertes, autofluoreszierendes Aggregat aus oxidierten quervernetzten Proteinen und Lipiden, das als Abfallprodukt entsteht und sich im zunehmenden Alter in verschiedenen Zelltypen ansammelt (Kennedy *et al.*, 1995; Sparrow & Boulton, 2005). Existierende Klassifikationen der BVMD basieren auf dem Fundusaspekt (Abb. 1.3). Zu Beginn erscheinen die Läsionen „eidotterartig“ (vitelliform). Im Verlauf werden sie umgebaut, wobei es zu dem sogenannten „Rührei-Stadium“ mit vielfältigen gelblichen Ablagerungen im retinalen Pigmentepithel kommt, und später teilweise aufgelöst. Die Einschränkung der Sehleistung tritt dabei häufig später auf, als der ophthalmologische Befund vermuten lassen würde. Wenn sie abgebaut werden, können die Läsionen jedoch Narben hinterlassen. In seltenen Fällen kommt es zu subretinalen Neovaskularisationen aus den Gefäßen der Chorioidea, was zu einem Visusverlust führen kann, der nicht mehr nur auf den zentralen Bereich beschränkt sein muss. Insgesamt ist die Ausprägung des Krankheitsbildes ebenso wie das Alter bei Beginn der Symptomatik und der zeitliche Verlauf sehr variabel (Boon *et al.*, 2009; A. D. Marmorstein *et al.*, 2009). Bisher konnten keine mutationsspezifischen Phänotypenunterschiede festgestellt werden. Vermutlich sind multiple genetische und Umweltfaktoren involviert (Boon *et al.*, 2009).

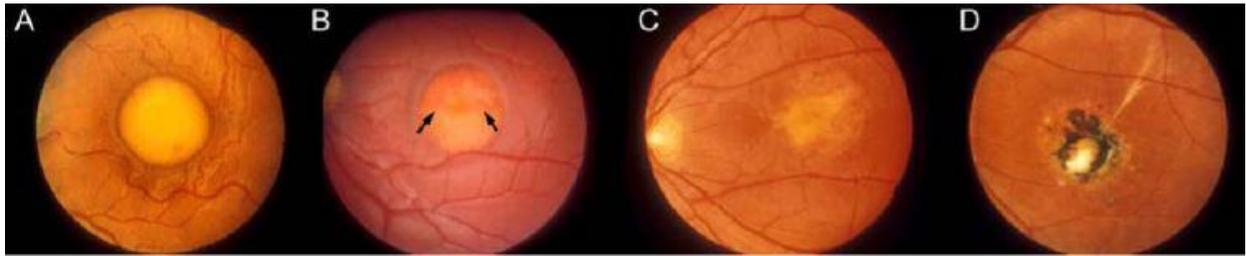


Abb. 1.3: Verschiedene ophthalmoskopische Befunde bei Morbus Best. **A:** Klassische vitelliforme Läsionen (Stadium IIa). **B:** Ausbildung sichtbarer Linien (Pfeile) innerhalb der Läsionen an der Grenze zwischen flüssigen und festen Anteilen (Stadium IIb). **C:** Sogenanntes Pseudohypopyon. Teilweise Resorption der Flüssigkeit innerhalb der Läsionen (Stadium III, „Röhrestadium“). **D:** Narbenbildung mit Hypo-, Hyperpigmentierung oder Neovaskularisation (Stadium IVa-c). Quelle: A. D. Marmorstein *et al.*, 2009

Patienten werden symptomatisch mit den nötigen Sehhilfen versorgt und regelmäßig der Verlauf kontrolliert. Darüber hinaus existieren lediglich experimentelle Ansätze. In Einzelfällen wurde beispielsweise von einem Ansprechen der Läsionen auf Laser-Photokoagulation oder intravitreale VEGF-Inhibitor-Injektionen berichtet (Andrade *et al.*, 2002; Boon *et al.*, 2009; Leu *et al.*, 2007). Um in Zukunft eine kausale Therapierbarkeit zu erreichen, ist es zuvor notwendig, weitere Erkenntnisse über die pathophysiologischen Grundlagen der BVMD zu erlangen.

1.3.2 Bestrophin-1

Das Genprodukt von BEST1 ist Bestrophin-1. Die genauen Funktionen von endogen exprimiertem Bestrophin-1 werden kontrovers diskutiert. Der Großteil der bisher verfügbaren Daten stammt aus Studien im heterologen Expressionssystem. Verschiedene Arbeitsgruppen kamen zu dem Schluss, dass Bestrophin-1 ein Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanal ist (Barro-Soria *et al.*, 2009; Hartzell *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2002). Kristallstrukturdaten unterstützen diese Hypothese (Kane Dickson *et al.*, 2014). Anderen Quellen zufolge handelt es sich um einen Volumen-regulierten Cl^- -Kanal oder Bestandteil eines solchen (Fischmeister & Hartzell, 2005; A. Milenkovic *et al.*, 2015; Stotz & Clapham, 2012). Darüber hinaus ist eine Durchlässigkeit für HCO_3^- dokumentiert (Qu & Hartzell, 2008). Diese Ergebnisse beruhen in erster Linie auf Beobachtungen an transfizierten HEK293-Zellen. Drei kürzlich publizierte Studien sprechen für eine Anionenkanalfunktion von Bestrophin-1 in der Zellmembran von humanem RPE (A. D. Marmorstein *et al.*, 2015; A. Milenkovic *et al.*, 2015; Moshfegh *et al.*, 2016). Bei der

Interpretation ist jedoch Vorsicht geboten, da indirekte Mechanismen nicht gänzlich ausgeschlossen sind und mit wenigen Kontrollen gearbeitet wurde (Johnson *et al.*, 2017). Widersprüchlich erscheint, dass das Knockin beziehungsweise das Knockout von *mBest1* in Mäusen zu keiner Veränderung der Cl⁻-Leitfähigkeit von RPE-Zellmembranen führt. Dagegen konnte eine Abweichung der Ca²⁺-Spiegel beobachtet werden (L. Y. Marmorstein *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Sowohl heterolog als auch endogen exprimiertes Bestrophin-1 beeinflussen den intrazellulären Ca²⁺-Haushalt. Verschiedene Untersuchungen demonstrierten eine Regulation spannungsabhängiger L-Typ-Ca²⁺-Kanäle durch Bestrophin-1 (Barro-Soria *et al.*, 2010; Hartzell *et al.*, 2008; L. Y. Marmorstein *et al.*, 2006; Reichhart *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008). Mit Ca_v1.3 konnte bisher für einen spannungsabhängigen L-Typ-Ca²⁺-Kanal eine direkte Interaktion gezeigt werden (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011a; Reichhart *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008). Inwiefern diese bei mutantem Bestrophin-1 verändert ist, wird derzeit in der Arbeitsgruppe um Univ.-Prof. Dr. Olaf Strauß untersucht. Bestrophin-1 scheint außerdem die Freisetzung von Ca²⁺ aus Speichern im endoplasmatischen Retikulum zu steuern (Johnson *et al.*, 2017; L. Marmorstein *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Es wurde vorgeschlagen, dass hierfür vor allem intrazellulär lokalisiertes Bestrophin-1 verantwortlich ist. In seiner Funktion als Anionenkanal könnte es etwa bei der Aufnahme von Ca²⁺ in zytosolische Speicher Cl⁻ als Gegenion transportieren (Neussert *et al.*, 2010; Strauß *et al.*, 2014; Strauß *et al.*, 2012). Zusätzlich zu den genannten Funktionen gibt es Belege, dass das Protein Ca²⁺-abhängige Cl⁻-Kanäle in der Plasmamembran moduliert (Barro-Soria *et al.*, 2010). Im Gehirn ist Bestrophin-1 an der Freisetzung der Neurotransmitter GABA und Glutamat beteiligt (Johnson *et al.*, 2017).

BEST1-mRNA findet sich außer im RPE auch in Gehirn, Hoden und Placenta (Marquardt *et al.*, 1998; Petrukhin *et al.*, 1998). Das Protein wurde zuerst in RPE-Zellen nachgewiesen und findet sich dort in der basolateralen Membran (A. D. Marmorstein *et al.*, 2000) oder im endoplasmatischen Retikulum in der Nähe dieser (Barro-Soria *et al.*, 2010; Strauß *et al.*, 2012). Bei Mäusen wurde darüber hinaus eine Expression im ZNS (Lee *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2009) und Spinalganglien (Boudes *et al.*, 2009) sowie in Spermien (A. Milenkovic *et al.*, 2015) beschrieben. Bestrophin-1 wurde 1998 identifiziert (Marquardt *et al.*, 1998; Petrukhin *et al.*, 1998). Es ist das am besten untersuchte Mitglied einer Gruppe von Anionenkanälen, die durch eine homologe Region mit vielen aromatischen Resten und einem konservierten „Arg-Phe-Pro“-Motiv charakterisiert ist. Ihr

N-Terminus ist hochkonserviert, der C-Terminus hingegen variabel. Zur Bestrophin-Familie zählen drei weitere humane Proteine, Bestrophin-2 bis -4. (A. D. Marmorstein *et al.*, 2009; Stöhr *et al.*, 2002; Tsunenari *et al.*, 2003) Außer Bestrophin-1 konnte auch Bestrophin-2 im Auge identifiziert werden, jedoch nur Bestrophin-1 im RPE (Bakall *et al.*, 2008; A. D. Marmorstein *et al.*, 2009). Humanes Bestrophin-1 besitzt ein Molekulargewicht von annähernd 68 kDa (Petrukhin *et al.*, 1998).

Vor kurzem gelang röntgenkristallographisch die Bestimmung der Kristallstruktur von Hühner-Bestrophin-1 (Abb. 1.4B/C) sowie von prokaryotischem *Klebsiella* Bestrophin-1 (Kane Dickson *et al.*, 2014; T. Yang *et al.*, 2014). Beide Studien lieferten sehr ähnliche Ergebnisse, was auf eine stark konservierte Struktur schließen lässt. Demnach besitzt jedes Protein vier Transmembrandomänen (TMD). Zwischen TMD1 und TMD2 sowie TMD3 und TMD4 findet sich jeweils eine kurze Aminosäuresequenz, die aufgrund ihrer Hydrophobie nur wenig in den Extrazellulärraum ragt. TMD2 und TMD3 verbindet eine größere intrazelluläre Schleife. Beide Termini liegen auf der zytosolischen Seite (Johnson *et al.*, 2017; Kane Dickson *et al.*, 2014; T. Yang *et al.*, 2014). Indem sie anhand verschiedener Bestrophin-1-Fragmente testeten, welche in Anwesenheit von *Escherichia coli* leader peptidase H1 (Lep H1) die Membran durchqueren, sagten Milenkovic *et al.* für humanes Bestrophin-1 2007 nahezu die gleichen TMD voraus (Abb. 1.4A) (Hartzell *et al.*, 2008; V. M. Milenkovic *et al.*, 2007). Jeweils fünf Bestrophin-1-Monomere lagern sich symmetrisch um eine zentrale Achse zu einem Ionenkanal zusammen (Kane Dickson *et al.*, 2014; T. Yang *et al.*, 2014). Hydrophobe Aminosäuren an zwei schmalen Stellen bilden einen Permeabilitätsfilter und behindern die Passage großer Ionen (Aminosäuren Ile 76, Phe 80 und Phe 84 sowie Val 205 bei Hühner-Bestrophin-1). Die erste dieser Restriktionen findet am Ort des engsten Durchmessers statt, der sogenannten Halsregion des Ionenkanals. Diese bestimmt vermutlich die für das Gating entscheidende Region. Der überwiegende Anteil der zytoplasmatischen Bestrophin-1-Abschnitte formt einen großen Hohlraum zwischen den beiden Engstellen. Anionen, die diese passieren können, werden von der positiven Ladung des inneren Hohlraums angezogen. Hier liegen auch die Ca²⁺-Clasps, die Ca²⁺-Bindungsstellen, über die mutmaßlich über Ca²⁺-abhängige Konformationsänderungen die Kanalöffnung gesteuert wird. Ein Ionenkanal enthält mindestens 15 Bindungsstellen für Anionen (Johnson *et al.*, 2017; Kane Dickson *et al.*, 2014). Bedacht werden muss, dass bisher nur die Kristallstruktur des Proteins im Ca²⁺-gebundenen Zustand untersucht wurde. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da

für große Moleküle wie GABA oder Glutamat keine Möglichkeit besteht, Bestrophin-1-Kanäle in dieser Konformation zu passieren. Eine Permeabilität für diese ist jedoch beschrieben (Johnson *et al.*, 2017).

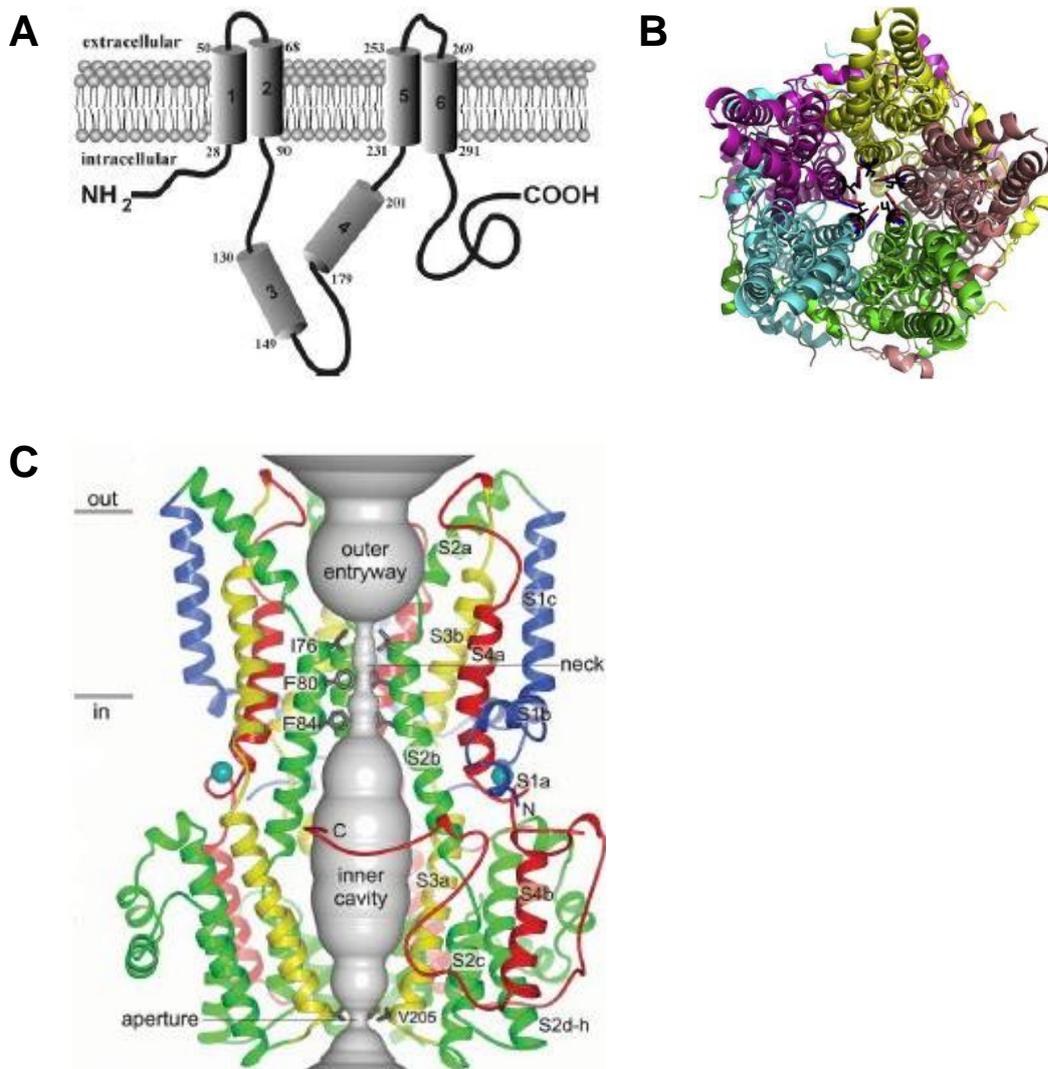


Abb. 1.4: Topologische Modelle für Bestrophin-1. **A:** Modell vorgeschlagen von V. M. Milenkovic *et al.*, 2007. Vier von sechs hydrophoben Bereichen, die potentielle TMD darstellen, durchqueren tatsächlich die Membran. Quelle: V. M. Milenkovic *et al.*, 2007 **B:** Darstellung des pentamerischen Kanals. Blick von oben auf den Ort der ersten Restriktion in der Halsregion mit farblicher Kennzeichnung der entsprechenden Aminosäuren. Ile 76 schwarz, Phe 80 rot, Phe 84 blau dargestellt. Quelle: Johnson *et al.*, 2017 **C:** Vereinfachte Darstellung des Ionenkanals. Sichtbar sind drei von fünf Untereinheiten (die vorderen beiden sind entfernt). Nur die äußere Öffnung und ein Teil der Halsregion befinden sich in der Zellmembran. Sekundäre Strukturelemente sind entsprechend ihrer Unterteilung in vier Segmente gefärbt. Quelle: Kane Dickson *et al.*, 2014

Mutationen im BEST1 führen außer zur BVMD noch zu einer Reihe weiterer Augenerkrankungen. Hierzu zählen die autosomal-dominante Vitreoretinochorioidopathie, die autosomal-rezessive Bestrophinopathie (ARB), die adulte foveomakuläre vitelliforme Dystrophie, Retinitis Pigmentosa und das MRCS-Syndrom (Mikrokornea – Zapfen-Stäbchen-Dystrophie – Katarakt – posteriores Staphylom) (Boon *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2009).

1.3.3 Pathogenese der BVMD

Es wurden bereits verschiedene mögliche Mechanismen diskutiert, diese konnten bislang aber nicht erklären, wie Mutationen im BEST1-Gen zur Symptomatik der BVMD führen. Die Ergebnisse der Studien erscheinen teilweise direkt widersprüchlich. Da BEST1 im Auge nur im RPE exprimiert wird, muss die retinale Degeneration ein Resultat einer veränderten RPE-Funktion sein. Es ist auffällig, dass es sehr viele krankheitsassoziierte Bestrophin-1-Varianten gibt. Beinahe alle untersuchten krankheitsassoziierten Mutationen verursachen eine Reduktion der Anionenleitfähigkeit (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b; Sun *et al.*, 2002; Tsunenari *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006). Mutante Bestrophine unterliegen einer mangelhaften Prozessierung und erreichen zum Teil nicht ihre übliche zelluläre Lokalisation. Stattdessen werden sie an verschiedenen Stellen im Zytoplasma, etwa im Golgi-Komplex, endoplasmatischen Retikulum oder in den frühen Endosomen, retiniert (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b; Mullins *et al.*, 2005). Es könnte sich dabei um einen ursächlichen Mechanismus handeln, der bei Mutationen zum Verlust der physiologischen Funktion führt.

Ursprünglich war die Annahme verbreitet, dass Bestrophin-1 in seiner Rolle als Ionenkanal für den LP im EOG verantwortlich ist. Dieser kommt durch Depolarisation der basalen RPE-Membran zustande. Eine Funktionseinschränkung würde folglich zu einer abgeschwächten Depolarisation und damit einem geringeren LP führen, vorausgesetzt, Bestrophin-1 fungiert hierfür als der entscheidende basolaterale Cl⁻-Kanal des RPE. Insbesondere die Zuordnung der TMEM16-Familie als Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Kanäle (CaCC) (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Y. D. Yang *et al.*, 2008) ließen daran jedoch Zweifel aufkommen. Alternativ könnte Bestrophin-1 als Regulator der Ca²⁺-Homöostase und Cl⁻-Kanal-Aktivität sekundär zu einem ähnlichen Effekt führen. In diesem Zusammenhang wurde unter anderem eine Modulation der TMEM16A-Leitfähigkeit durch Bestrophin-1 nachgewiesen (Barro-Soria *et al.*, 2010). Dementgegen steht die

Beobachtung von Marmorstein *et al.*, dass in *mBest1*-knockout-Mäusen der Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanal unverändert und der LP sogar supernormal ist. Überexpression von Bestrophin-1-Wildtyp (Bestrophin-1-Wt) führte zu keiner Verstärkung des LP. In weiterführenden Experimenten kam die Gruppe um A. D. Marmorstein zu dem Ergebnis, dass über eine $\beta 4$ -Untereinheit regulierte spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle für den LP notwendig sind und Bestrophin-1 die Entstehung des LP eher antagonisiert. Mutationen im BEST1-Gen sollten demzufolge am ehesten zu einem Funktionsgewinn (gain of function) führen. Welche zellulären Abläufe genau davon betroffen sind, bleibt jedoch offen. Zudem lässt sich der Sehverlust, unter dem BVMD-Patienten leiden, dadurch nicht erklären, sodass die hierfür ursächlichen Mechanismen weiterhin aufgeklärt werden müssen (L. Y. Marmorstein *et al.*, 2006). Für zwei separate Mechanismen spricht auch die Entdeckung einiger weniger BEST1-Mutationen, die zu Erkrankungsfällen ohne veränderten LP führen (Yu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007). Es ist belegt, dass Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle für zahlreiche Funktionen des RPE entscheidend sind, darunter Sekretionsmechanismen verschiedener Faktoren und die Phagozytose. Störungen der Ca^{2+} -Regulation bewirken eine gestörte Kommunikation des RPE mit den Photorezeptoren, sodass hier vielleicht nach einer Ursache für den Sehverlust bei Patienten zu suchen ist (Rosenthal & Strauss, 2002; Strauss, 2005).

Ein charakteristisches Merkmal bei BVMD ist die Akkumulation von lipofuszinartigem Material. Eine Ansammlung von Lipofuszin findet sich üblicherweise bei lysosomalen Krankheiten. In RPE-Zellen, die unter anderem auf Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten spezialisiert sind, gibt es eine sehr große Menge an Lysosomen, sodass der Gedanke naheliegt, dass Mutationen im Bestrophin-1 zu Funktionsstörungen der Lysosomen führen. Es wird vermutet, dass unphagozytierte abgestoßene Photorezeptoraußensegmente toxische Lipofuszinvorstufen enthalten, die die Photorezeptoren schädigen. Eventuell sind dabei zusätzlich oxidative Schäden von Bedeutung (Boon *et al.*, 2009; Guziewicz *et al.*, 2017; Hartzell *et al.*, 2005; Moskova-Doumanova *et al.*, 2013). Welche Rolle genau Bestrophin-1 dabei spielt, muss noch erforscht werden. Auch wenn bislang nicht genau verstanden ist, wie Phagozytoseprozesse im RPE reguliert werden, weiß man, dass dem intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel dabei eine Bedeutung zukommt (Strauss, 2005). Es konnte außerdem eine regulatorische Rolle von BK-, TRPV-Kanälen und $\text{Ca}_v1.3$ gezeigt werden. BK-Kanäle und

Ca_v1.3 sind in vivo für die zirkadiane Rhythmik der Phagozytoseaktivität von Bedeutung (Müller *et al.*, 2014). Bestrophin-1 nimmt deshalb vermutlich indirekt über eine Modulation von Ca_v1.3 Einfluss. Darüber hinaus könnte es über Veränderungen der Ca²⁺- sowie möglicherweise der Cl⁻- oder HCO₃⁻-Homöostase und somit über eine Regulierung des Ionenhaushalts und pH-Wertes auf die Phagozytose wirken (Hartzell *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2014).

Unklar ist auch, warum Morbus Best ausgerechnet die Makula befällt. Dies erscheint paradox, da eine Expression von Bestrophin-1 besonders in den peripheren Regionen der Retina nachgewiesen werden konnte (Mullins *et al.*, 2007).

1.4 Rab27a

Rab27a gehört zur Familie der Rab-Proteine, einer evolutionär hochkonservierten Familie von GTPasen. Rab steht für „Ras-related in brain“ oder „Ras-like proteins in brain“. Derzeit sind im Menschen über 60 verschiedene Rab-Proteine bekannt (Hutagalung & Novick, 2011; Pereira-Leal & Seabra, 2001; Stenmark & Olkkonen, 2001). GTPasen sind Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine (G-Proteine) mit einer entscheidenden Position in der Signaltransduktion diverser zellulärer Prozesse. Rab-Proteine dienen dabei als „molekulare Schalter“, die Schlüsselpositionen bei intrazellulären Transportmechanismen einnehmen. Als Regulatoren sind sie wesentlich an den Transportschritten beginnend mit der Vesikelbildung über den intrazellulären Transport bis hin zur Fusion am Zielort beteiligt, wobei für jeden Schritt bestimmte, mitunter gewebespezifische Rab-Proteine zuständig sind. Rab-Proteine wechseln zwischen einem GTP-gebundenen, aktiven und einem GDP-gebundenen, inaktiven Zustand (Abb. 1.5). Während Rab-GTP an die zugehörige zelluläre Membran gebunden vorliegt, dissoziiert Rab-GDP meist von dieser und findet sich dann frei im Zytosol. Rab-Proteine unterliegen einer posttranslationalen Modifikation, der Geranylgeranylierung (Prenylierung). Jedes Rab-Protein rekrutiert spezifische Effektoren, Proteine, die in der Regel mit der aktiven Form des Rab-Proteins interagieren und die Vesikel auf ihrem Weg durch die Zelle begleiten (Ali & Seabra, 2005; Hutagalung & Novick, 2011; Stenmark & Olkkonen, 2001).

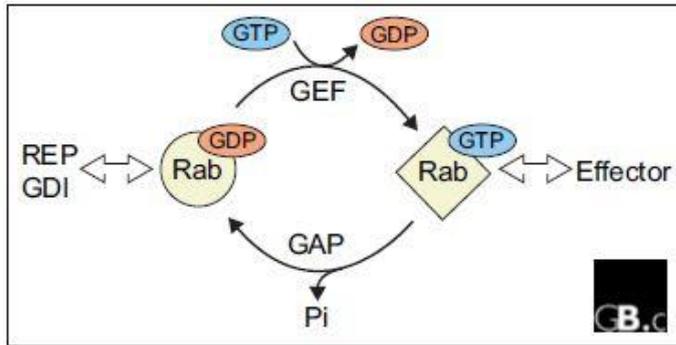


Abb. 1.5: Der Rab-Zyklus. Wenn ein Rab-Protein translatiert wird, bindet es an Rab Escort Protein (REP), das es der Rab-Geranylgeranyltransferase (RabGGT) präsentiert. Durch diese werden an den COOH-Terminus meist zwei Geranylgeranyl-Lipidgruppen angehängt, die bei der folgenden Membranbindung helfen. Ein GDP-Dissoziationsinhibitor (GDP dissociation inhibitor, GDI) stabilisiert den inaktiven Zustand. Ein GTP-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor, GEF) katalysiert den Wechsel von Rab-GDP zu Rab-GTP. Dieses interagiert mit seinen Effektorproteinen. Die intrinsische Hydrolyseaktivität von Rab-Proteinen ist gering, sodass GTPase-aktivierende Proteine (GTPase accelerating protein, GAP) nötig sind, um Rab-GTP wieder in Rab-GDP umzuwandeln. Mithilfe von GDI wird das inaktive Rab-GDP aus der Membran gelöst. Quelle: Stenmark & Olkkonen, 2001

Zum heutigen Zeitpunkt sind zwei Rab27-Isoformen bekannt. Rab27a und Rab27b stimmen in ihrer Aminosäuresequenz zu 71 % überein und scheinen funktionell zumindest zum Teil auswechselbar zu sein, kommen jedoch nicht gleichermaßen in allen Geweben vor (Barral *et al.*, 2002; Ramalho *et al.*, 2001). Das RAB27A-Gen liegt auf Chromosom 15q15-q21.1 (Tolmachova *et al.*, 1999). Die unprenylierte Form hat ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa (Seabra *et al.*, 1995). Rab27 ist nah verwandt mit Rab3 (Pereira-Leal & Seabra, 2001).

Rab27a findet sich in diversen Geweben und Zelltypen, wo es eine wichtige Komponente verschiedener exozytischer Prozesse ist. Zu den Organen, in denen es reichlich vorliegt, gehören das Auge, die Lunge, der Gastrointestinaltrakt, das Pankreas, die Milz und das hämatopoetische System. Es ist überwiegend in Zellen mit sekretorischer Funktion wie beispielsweise endo- und exokrinen Zellen und lysosomalen Organellen wie Lysosomen vertreten. Rab27a wurde auch im RPE nachgewiesen (Fukuda, 2008; Tolmachova *et al.*, 2004).

Bekanntere Effektoren, die sogenannten Exophilinen, umfassen Moleküle aus drei Untergruppen: Der Slp (Synaptotagmin-Like-Proteins)-Familie, der Slac2 (Slp-Lacking

C2 Domains)-/Noc2 (No C2 Domain Protein)-Familie und der Munc13-4 (Mammalian Uncoordinated)-Familie (Abb. 1.6). Die meisten Rab27a-Effektoren besitzen N-terminal relativ konservierte, 150 Aminosäuren lange Rab27-Bindungsdomänen (R27BD). Diese enthalten Slp homology-Domänen (SHD), üblicherweise bestehend aus zwei α -helikalen Regionen (SHD1 und SHD2), die häufig über Zinkfinger-Motive verknüpft sind. Mitglieder der Slp-Familie verfügen zusätzlich über C-terminale Tandem-C2-Domänen, die den Slac2-Proteinen fehlen. Alle SHD mit Ausnahme von Slp4-SHD fungieren als spezifische Interaktionsdomänen für Rab27, ergo Rab27a und Rab27b (Fukuda, 2005; Pfeffer, 2005). Der Rab27-Effektor Munc13-4 besitzt als einziger keine SHD und bindet über eine bislang nicht vollständig aufgeklärte Struktur, umrahmt von einer C2- und der sogenannten MUN-Domäne, von der jedoch einige Schlüsselbereiche bekannt sind (Elstak *et al.*, 2011; Fukuda, 2005).

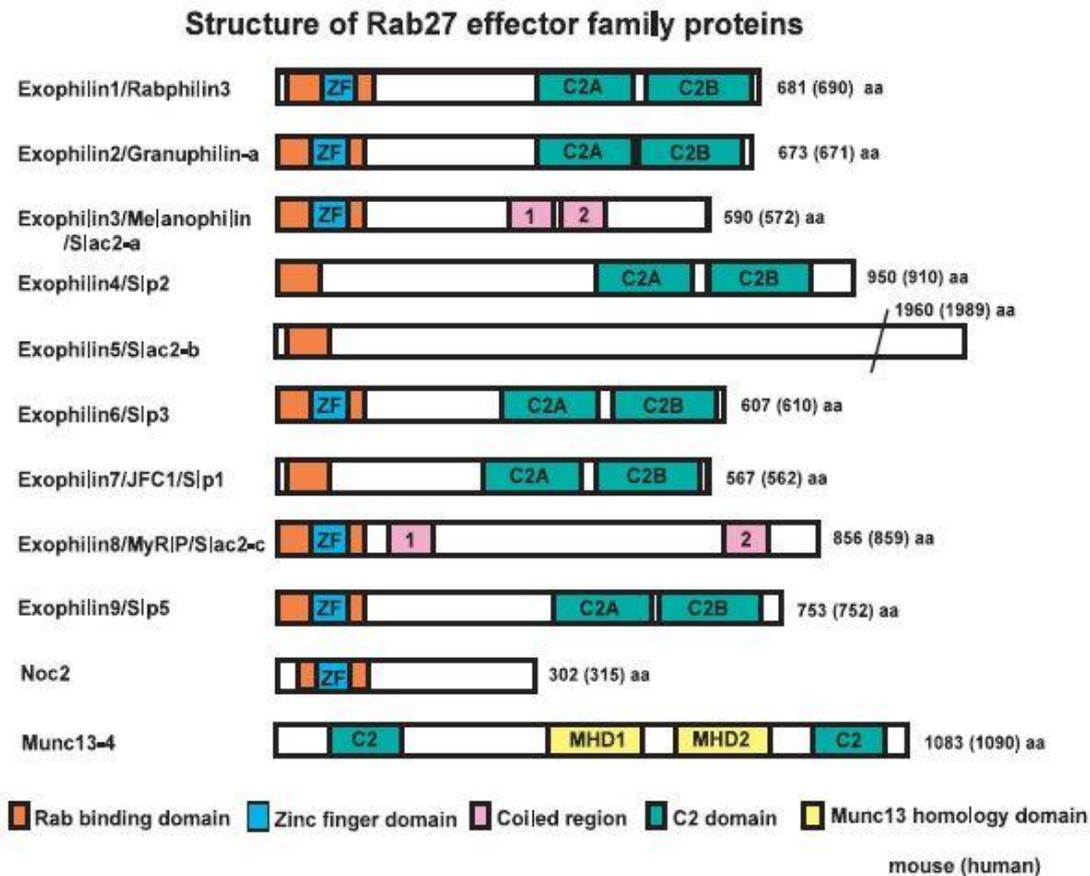


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Rab27-Effektoren. Die Nummern rechts entsprechen der Aminosäureanzahl der entsprechenden Genprodukte von Mäusen bzw. von Menschen (in Klammern). Quelle: Izumi, 2007

Zu den Interaktionspartnern von Rab27a zählen der epitheliale Na⁺-Kanal ENaC und der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Beide werden durch Rab27a inhibiert. Die Anwesenheit der Effektorproteine SLP-5 oder Munc13-4 hebt diesen Effekt jeweils auf (Saxena *et al.*, 2006; Saxena & Kaur, 2006b; Saxena *et al.*, 2005). Außer der eigenen Kanalfunktion erfüllt CFTR auch eine regulatorische Funktion in Bezug auf andere Ionenkanäle, darunter ENaC. Vor kurzem wurde eine weitere Wechselwirkung zwischen Rab27a und einem Ionenkanal nachgewiesen. Rab27a interagiert über eine MyRIP-homologe Aminosäuresequenz im II-III Linker der Cav1.3-Untereinheit direkt mit dem bereits erwähnten L-Typ-Ca²⁺-Kanal Cav1.3 und reduziert dessen Aktivität, indem es die Anzahl der Kanäle in der Zellmembran vermindert. Dies führt zu verminderter VEGF-Sekretion durch das RPE (Reichhart *et al.*, 2015).

Rab27a war das erste Rab-Protein, das mit einer Erkrankung in Zusammenhang gebracht wurde, dem Griscelli-Syndrom Typ II. Das Griscelli-Syndrom ist eine seltene autosomal-rezessive Erkrankung. Funktionsverlust von Rab27a führt bei Betroffenen zu einer Immundefizienz, da lytische Granula zytotoxischer T-Lymphozyten nicht korrekt freigesetzt werden können. Später entwickeln die Patienten durch unkontrollierte Makrophagen- und T-Lymphozytenaktivierung meist ein hämophagozytisches Syndrom. Ein eingeschränkter Melanosomentransport führt zudem zu partiellem Albinismus mit silbriger Haarfarbe (Bahadoran *et al.*, 2001; Ménasché *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2001; Seabra *et al.*, 2002). Mittlerweile wurden weitere Erkrankungen mit Rab27a in Verbindung gebracht. Bei der Chorioideremie, die durch progressive Atrophie der Aderhaut, Retina und des RPE zu Blindheit führen kann, besteht durch das Fehlen von REP-1 ein funktioneller Mangel an Rab27a im retinalen Gewebe (Seabra *et al.*, 1995). In pankreatischen β -Zellen ist Rab27a an der Rekrutierung und dem Andocken von Insulinvesikeln an die Plasmamembran involviert und wird als potentieller therapeutischer Angriffspunkt bei Diabetes mellitus Typ II diskutiert (Abderrahmani *et al.*, 2006; Aizawa & Komatsu, 2005). Rab27a kann als Biomarker für verschiedene Tumorerkrankungen wie zum Beispiel Mammakarzinome, kolorektale Karzinome, Pankreaskarzinome oder Gliome hinzugezogen werden, wobei hohe Expressionslevel außer beim kolorektalen Karzinom häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Dong *et al.*, 2015; H. Wang *et al.*, 2014; J.-S. Wang *et al.*, 2008; Q. Wang *et al.*, 2015).

1.5 Fragestellung

Die Pathomechanismen der BVMD sind nach wie vor unklar. Die Identifikation der verantwortlichen Mechanismen wird dadurch erschwert, dass es sich bei dem mutierten Bestrophin-1 um ein multifunktionales Protein handelt, welches auf unterschiedlichen Wegen zu den verschiedenen Befunden bei Patienten mit BVMD zu führen scheint (s. Kap. 1.3.3). Fehlerhafter subzellulärer Transport des Bestrophin-1 könnte dabei eine Rolle spielen. Bisher wurden die Transportvorgänge, denen Bestrophin-1 in der Zelle unterliegt, und die involvierten Faktoren jedoch nicht sehr ausführlich untersucht. In der vorliegenden Studie sollten diese Vorgänge deshalb näher beleuchtet werden. Dabei lag die kleine GTPase Rab27a im Fokus. Es gibt mehrere Gründe, warum Rab27a ein vielversprechender Kandidat für einen beteiligten Faktor ist. Es handelt sich um ein Transportprotein, das im RPE exprimiert wird. Seine Beteiligung an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen ist bereits nachgewiesen, darunter mit der Chorioideremie auch eine Augenkrankheit. Bestrophin-1 weist mehrere Parallelen zu dem bekannten Rab27a-Interaktionspartner CFTR auf. In beiden Fällen handelt es sich um multifunktionelle Proteine, die sowohl selbst Cl⁻-Kanäle sind als auch die Aktivität anderer Kanäle modulieren. Erste Daten deuten auf eine Interaktion zwischen Rab27a und wildtypischem Bestrophin-1 hin (Krejцова, 2007, pers. commun.; Wagner, 2014).

Diese Studie hatte zum Ziel, eine potentielle physikalische Interaktion von Bestrophin-1 mit Rab27a aufzudecken und nach Möglichkeit die Art der Wechselwirkung und eine etwaige Bindungsdomäne zu bestimmen. Ferner sollten Einflüsse von BVMD-assoziierten Punktmutationen des bei der Krankheit mutierten Bestrophin-1 auf diese Wechselwirkung untersucht werden. Die Hypothese war, dass Rab27a mit Bestrophin-1 interagiert und für die Entstehung der BVMD-Symptomatik relevant ist, möglicherweise über eine Beeinflussung der intrazellulären Bestrophin-1-Verteilung.

Um dem nachzugehen, sollte Rab27a in Kombination mit Bestrophin-1-Wt beziehungsweise mehreren repräsentativen Bestrophin-1-Mutanten immunzytochemisch und in Koimmunpräzipitationen untersucht werden. Als Expressionssystem wurden CHO-Zellen ausgewählt.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Autoklav Vertikaler Standautoklav VE-75	Systec
Brutschrank Hera cell	Heraeus
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele, Power Pac 1000	Bio-Rad
Elektrophoresesystem für Polyacrylamid-Gele, Mini Protean® Tetra System	Bio-Rad
Inkubationsschüttler Orbital Incubator S150	Stuart
Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler
Konfokales Mikroskop LSM 510	Zeiss
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad
PCR-Gerät iCycler	Bio-Rad
Präzisionswaage LA 310 S	Sartorius
Sicherheitswerkbänke HERAsafe	Heraeus
Spectrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trocken- und Wärmeschrank FP53	Binder
Überkopfschüttler SB2 Rotator	Stuart
UV-Transilluminator TI3	Biometra
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifugen Biofuge Primo R, Labofuge 400R, Megafuge 1.0R	Heraeus

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
12-Loch-Zellkulturplatten Falcon	Corning
Blotting-Filterpapier, dick	Bio-Rad
Deckgläser, 12 mm und 15 mm	Thermo Fisher Scientific
Impfösen Ino-Loop 1µl	Simport
Objektträger	Menzelgläser
Polypropylenröhrchen, 14 ml Falcon	Corning
Polystyrenröhrchen, 15 ml und 50 ml Falcon	Corning
PVDF-Membran für Proteine	Bio-Rad
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf

Zellkulturflaschen 25 cm ² Falcon	Corning
Zellkultur-Petrischalen 100 mm Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific
Zellschaber 25 cm 2-position blade	Sarstedt

2.3 Chemikalien

Handelsübliche Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Carl Roth, Fluka, MERCK und Sigma-Aldrich bezogen. Nachfolgend aufgeführt sind spezielle Chemikalien, die darüber hinaus eingesetzt wurden:

Chemikalie	Bezugsquelle
Cobalt-Beads HisPur™ Cobalt Resin	Thermo Fisher Scientific
Protein G-Agarose-Beads	Roche
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Probenpuffer 4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad
Quick Load® Purple 2 Log DNA Ladder	New England BioLabs
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England BioLabs
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	US Biological
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	MERCK
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

2.4 Zelllinien und Bakterienstämme

Zellen	Bezugsquelle	Katalog-Nr.
CHO-K1 Zellen	ATCC	#CCL-61
<i>Escherichia coli</i> , XL1 Blue Competent Cells	Agilent Technologies	#200249

2.5 Antikörper

2.5.1 Primäre Antikörper für Western Blot und Immunzytochemie

Antikörper	Bezugsquelle	Katalog-Nr.	Verdünnung
anti-Bestrophin-1-AK, Maus, monoklonal	Abcam	ab2182	1 : 1000-2000
anti-His-AK, Kaninchen, polyklonal	Abcam	ab9108	1 : 1000
anti-Pan-Rab27-AK, Ziege, polyklonal	SICGEN	AB7223-200	1 : 1000
anti-α5β1-Integrin-AK, Kaninchen, polyklonal	Biorbyt	orb13515	1 : 250

2.5.2 Sekundäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Bezugsquelle	Katalog-Nr.	Verdünnung
HRP Esel-anti-Kaninchen-AK	GE Healthcare	NA934	1 : 2500
HRP Schaf-anti-Maus-AK	GE Healthcare	NA931	1 : 5000
HRP Kaninchen-anti-Ziege-AK	Millipore	AP106P	1 : 5000
HRP Huhn-anti-Maus-IgG	Thermo Fisher	A15981	1 : 5000

2.5.3 Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie

Antikörper	Bezugsquelle	Katalog-Nr.	Verdünnung
Esel-anti-Kaninchen-IgG, AF488	Thermo Fisher	A21206	1 : 5000
Esel-anti-Maus-IgG, AF647	Abcam	ab150111	1 : 1000
Ziege-anti-Maus-IgG, AF546	Thermo Fisher	A11003	1 : 5000

2.6 Käuflich erworbene Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pGem-T	Promega
pCDNA3.1	Thermo Fisher Scientific

2.7 Primer

Primer wurden bei eurofins oder biomers.net bestellt.

2.8 Enzyme und Kits

Kits	Bezugsquelle
2x Red PCR Master Mix	STRATEC
Complete Mini protein inhibitor mixture, Tabletten	Roche
Detektionsreagenz Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad
GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit	Roboklon
GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit	Roboklon
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two	STRATEC
Lipofectamine® 2000 Reagent	Invitrogen
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific

Restriktionsenzyme (AgeI, EcoRI, PvuII, XhoI) und - puffer	New England BioLabs
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs

2.9 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen

2.9.1 Käuflich erworbene Medien und Medienzusätze

Medien	Bezugsquelle
Dulbecco's modified eagle's medium DMEM/HAM-F12	Sigma-Aldrich
Dulbecco's phosphate buffered saline DPBS	Life Technologies (Thermo Fisher)
Opti-MEM® serumreduziertes Medium	Life Technologies (Thermo Fisher)
Fluorescent Mounting Medium	Dako

Medienzusätze	Bezugsquelle
Ampicillin Ready Made Solution	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom

2.9.2 Rezepte

2.9.2.1 Klonierung

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
950 ml dH₂O
pH 7,0, Volumen dann auf 1 l
Autoklavieren (liquid cycle, 20 min, 15 psi)
Auf 55 °C abkühlen lassen, dann
Antibiotikum dazu (Ampicillin 2,5 ml/l)

LB-Agar-Platten

Wie LB-Medium, zusätzlich:
20 g/l Agar

Bei 55 °C Antibiotikum dazu, dann
Platten gießen

SOB-Medium

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
dH₂O auf 1 l
Autoklavieren, vor Benutzung frisch dazu:
10 ml Filter sterilisiertes 1 M MgCl₂
10 ml Filter sterilisiertes 1 M MgSO₄

SOC-Medium

Frisch zubereiten!
2 ml filtersterilisierte 20 % Glukose
oder
1 ml filtersterilisierte 2 M Glukose

Autoklaviertes SOB-Medium bis zu einem
Endvolumen von 100 ml

2.9.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

50x Tris-Acetat-EDTA- Elektrophorese-Puffer (TAE)

2 M	Tris
1 M	Essigsäure
50 mM	EDTA

2.9.2.3 Koimmunpräzipitation

Lysispuffer nach Rosenthal

154 mM	NaCl
50 mM	1 M Tris-HCl
1 mM	Natriumorthovanadat
0,001 %	NaF
pH 7,6 mit HCl	
0,01 %	Triton-X-100
12 mM	Natriumdeoxycholat
0,052 %	EDTA
Frisch dazu: Aprotinin (1 : 1000), PIC (1 : 100)	

Lysispuffer für Cobalt-Beads

150 mM	TrisHCl
150 mM	NaCl
1 %	Nonidet P40
0,5 %	Natriumdeoxycholat
pH 7,5	
Dazu:	
40 µl/l Complete Roche Mini 25x Solution	

Waschpuffer für Agarose-Beads

0,01 %	Triton-X-100
12 mM	Natriumdeoxycholat
0,00026 %	EDTA (5 mM)

Waschpuffer für Cobalt-Beads

50 mM	TrisHCl
150 mM	NaCl
1 %	Nonidet P40
0,5 %	Natriumdeoxycholat
10 mM	Imidazol (aus 1 M Stammlösung)
pH 7,5	

2.9.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

SDS-Trenngel (10 %)

3,96 ml	dH ₂ O
2,5 ml	1,5 M Tris pH 8,8
0,1 ml	10 % SDS
3,33 ml	30 % Acrylamid
0,1 ml	10 % APS
0,01 ml	TEMED

SDS-Sammelgel (5 %)

6,87 ml	dH ₂ O
1,25 ml	0,5 M Tris pH 6,8
0,1 ml	10 % SDS
1,67 ml	30 % Acrylamid
0,1 ml	10 % APS
0,01 ml	TEMED

10x SDS-Laufpuffer

250 mM	Tris Base
1,92 M	Glycin
1 %	SDS

Transferpuffer

100 ml	10x SDS
200 ml	Methanol
700 ml	dH ₂ O

10x TBS

1,5 M	NaCl
100 mM	Tris

TBST 0,05 %

1 l	1x TBS
500 µl	Tween

Auf ca. 700 ml H₂O auffüllen, dann pH 8,1-8,5 einstellen, dann erst auf Gesamtvolumen von 1 l

2.9.2.5 Immunzytochemie

10x TBS

1,5 M NaCl
100 mM TrisHCl
46 mM Tris base
pH 7,6

2.10 Plasmide und Klonierung

2.10.1 Verwendete Plasmide

Im Folgenden sind alle Plasmide aufgeführt, die in den Experimenten zum Einsatz kamen. Sie standen dem Labor bereits in der Form zur Verfügung oder wurden von mir selbst kloniert. Sämtliche Bestrophin-Punktmutationen stammen aus der Arbeit von Vladimir Milenkovic zu krankheitsassoziierten Missense-Mutationen (2011).

Plasmid	Hergestellt von
hBest1wt	A. D. Marmorstein (Rochester, USA)
hBest1F305S pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)
hBest1F80L pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)
hBest1R218C pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)
hBest1T6P pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)
hBest1del 380-456 pGEM	Diese Arbeit
hBest1del 1-292+457-575 pGEM	N. Reichhart (Berlin)
hBest1del 1-292 pGEM	N. Reichhart (Berlin)
hBest1del1-50 pGEM	Diese Arbeit
hBest1del 320-350+457-570 pCDNA3.1 (+)c-myc	N. Reichhart (Berlin)
Rab27a pCDNA3.1 (+)6xHis	V. Milenkovic (Regensburg)

2.10.2 Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5' -> 3')	Zweck
hVMD2XhoI_F	ATCGCTCGAGCCACCATGACCATCACTTACACA	Mutagenese
hBest1137EcoRI_R	GAATTCCTGATTGGGCTGGAACTCCATCT	Mutagenese
hBest1371EcoRI_F	GAATTCAGTGTATCAGAGGCCAGGCTACT	Mutagenese
hBest1Age_R	CGTACCGGTGGAATGTGCTTCATCCCT	Mutagenese
hBest151_F	GGTACCATGAGGCTGGCCCTCACG	Mutagenese
M13_F	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung

M13_R	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierung
VMD2-369_F	AATAAGCCCGAGCCACAGCC	Sequenzierung
VMD2-496_R	GTCTTTGGTGTCTATGCCTG	Sequenzierung

2.10.3 Vervielfältigung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu replizieren, wurden, sofern vorhanden, Bakterien mit den entsprechenden Inserts aus Glycerolstöcken wieder ausplattiert und die DNA im Anschluss extrahiert. Alternativ dazu konnte eine kleine Menge des vorhandenen Plasmids in einem Restriktionsverdau und einer nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese isoliert werden. Nach Ligation der so gewonnenen DNA in einen Vektor fand die Transformation in Bakterien statt. In einer Maxipräparation wurden die Plasmide aufgereinigt (Abb. 2.1A).

Das genaue Vorgehen bei den einzelnen Schritten wird in den jeweiligen Kapiteln erklärt.

2.10.4 PCR-gesteuerte Mutagenese

2.10.4.1 Allgemeine Vorgehensweise

Zur zielgerichteten Erzeugung von Deletionsmutationen kam die qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Einsatz. Mit ihrer Hilfe konnten durch den Einsatz passend entworfener Primer genau die gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt werden. Die PCR-Produkte wurden in einen Vektor ligiert, mit dessen Hilfe sie zur weiteren Vermehrung in Bakterien eingeschleust wurden (Transformation). Nach einer Kontrolle durch Minipräparationen wurde die DNA in einer Maxipräparation aus den Bakterien zurückgewonnen und so gleichzeitig ihre Konzentration erhöht (Abb. 2.1B). Je nach herzustellender Mutante wurden daraufhin zwei derart gewonnene Stücke ligiert und erneut transformiert (Abb. 2.1C). Vor dem ersten Gebrauch wurden die Mutanten sequenziert.

2.10.4.2 PCR

Als Basis diente das humane Bestrophin-1-Wt-Plasmid. Die Zusammensetzung der Proben war folgende: 1-fache Konzentration an 2x Red PCR Master Mix (25 µl bei einem Endvolumen von 50 µl pro PCR-Tube), 0,3 µM 5'-Primer, 0,3 µM 3'-Primer, 50 ng DNA pro Reaktion. Der Rest wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Jede PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	95 °C 5 min
30 - 33 Zyklen	95 °C 30 sec
	63 °C 30 sec
	72 °C 90 sec
	72 °C 7 min
	4 °C ∞

Die Klonierung des hBest1del 380-456 pGEM erfolgte in zwei Teilschritten. Erst wurden mithilfe der Primerpaare hBest1371EcoRi_F und hBest1Age_R sowie hVMD2xho_F und hBest1137EcoRi_R in einer PCR der vordere und der hintere zu erhaltende DNA-Abschnitt des BEST1-Gens vervielfältigt. Die beiden Abschnitte wurden zu einem späteren Zeitpunkt ligiert. Die PCR-Produkte wurden per Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die DNA bei korrekter Größe aus den Gelen extrahiert (s. Kap. 2.10.11). Zur Ermöglichung mehrerer Versuche bei der Ligation wurden die Einzelstücke an dieser Stelle in einen Vektor ligiert und transformiert (genaues Vorgehen s. Kap. 2.10.4.4 und 2.10.5).

Die Mutante hBest1del 1-50 pGEM wurde mit den Primern hBest151_F und AgeL_R erzeugt und sofort in den Vektor eingebracht.

2.10.4.3 Ligation zweier DNA-Fragmente

Die mittels Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese wiedergewonnenen BEST1-Abschnitte für die Mutante hBest1del 380-456 pGEM wurden mit T4 DNA Ligase zusammengefügt. Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen. Über die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme können dabei zueinander passende Enden generiert und so die Anordnung der Genabschnitte innerhalb der Fragmente gesteuert werden. Auf diese Weise entstand ein neues BEST1-Gen mit einer Deletion der Aminosäuren 380-456.

Die Ligationsreaktion setzte sich aus 4 µl 5x T4 DNA Ligase Puffer, jeweils 50 ng von DNA 1 und DNA 2 und 1 µl T4 DNA Ligase zusammen. Sie wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Entscheidend war, dass das Enzym als letztes hinzugefügt wurde, damit die Reaktion nicht vorzeitig in Gang kam. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht. Am folgenden Tag wurde das Enzym bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Es folgte wiederum die Überprüfung und Reinigung per Agarose-Gelelektrophorese.

2.10.4.4 Ligation in den Vektor

Zum Einschleusen und Erhalt der DNA in Bakterien benötigt man einen Plasmid-Vektor. Es wurde der pGEM®-T Easy Vektor von Promega benutzt. Zur Ligation der aus PCR-Mutagenese oder der zuvor beschriebenen Ligation stammenden DNA-Fragmente in den Vektor wurde ein Verhältnis von 1 : 1 zwischen Vektor und DNA gewählt. Für einen Ansatz mit 50 ng Vektor (1 µl) wurde auch 1 µl (3 Weiss units) T4 DNA Ligase verwendet. Als Puffer diente ½ Volumen T4 DNA Ligase 2x Rapid Ligation Buffer, der Rest wurde mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Wenn die DNA-Konzentration es zuließ, erfolgte die Standardreaktion mit einem Gesamtvolumen von 10 µl. Die Ligationsreaktion inkubierte bei 4 °C über Nacht. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz transformiert.

2.10.5 Kompetente Bakterien und Transformation

Transformation bezeichnet die Aufnahme des Plasmids durch kompetente, d.h. zur Aufnahme freier DNA befähigte, Bakterien. Deren Fähigkeit der Vermehrung durch Zellteilung macht man sich zunutze, um viele identische Kopien (Klone) des gewünschten DNA-Fragments zu erhalten. Dieses Prinzip wurde sowohl zur Reproduktion bereits bestehender Plasmide ohne vorhandenen Glycerolstock als auch im Prozess der Entwicklung neuer Mutanten genutzt. Als kompetente Bakterien dienten *Escherichia coli* (E. coli), XL1 Blue Competent Cells.

Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock nach Standardprotokoll. Sämtliche Schritte ohne abweichende Angaben wurden auf Eis durchgeführt. Die tiefgefrorenen E. coli-Zellen wurden kurz auf Eis aufgetaut und zur Erhöhung der Transformationseffizienz 10 min mit 1,7 µl 1,42 M β-Mercaptoethanol vorinkubiert. Es wurden Aliquots von 100 µl Zellsuspension pro Ansatz verwendet. Im Folgenden wurden etwa 50 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte der Hitzeschock 45 s im Wasserbad bei 42 °C. Vor der Zugabe von 0,9 ml vorgewärmtem SOC-Medium inkubierten die Zellen weitere 2 min auf Eis. Bei 37,5 °C wurden die Zellen 1 h bei 225-250 Umdrehungen pro Minute (rpm) geschüttelt. Es wurden LB-Ampicillin-Agarplatten mit jeweils ca. 100-200 µl der Suspension beimpft. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank (FP53, Binder) wachsen gelassen.

2.10.6 Identifizierung der richtigen Kolonien

Jede der gewachsenen Bakterienkolonien wird von einem Klon gebildet. Es gilt unter allen Kolonien diejenigen zu finden, die nach erfolgreicher Transformation das richtige DNA-Fragment enthalten. Um eine Vorauswahl zu treffen und so die Anzahl nötiger Versuche zu reduzieren, kamen zwei Methoden zum Einsatz.

2.10.6.1 Selektion durch Antibiotikaresistenz

Beim Gießen der Agarplatten wurden diese mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Dadurch konnten auf den Platten nur solche E. coli wachsen, die im Besitz eines Ampicillin-Resistenzgens waren. Dieses wurde als sogenannter Selektionsmarker zusammen mit dem pGEM®-T-Easy-Vektor in die Zellen eingeführt, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass nur Kolonien von Bakterien wuchsen, bei denen eine Transformation stattgefunden hatte. Diese Methode lässt allerdings noch keine Rückschlüsse zu, ob sich das gewünschte Insert in dem Vektor befindet.

2.10.6.2 Blau-weiß-Selektion

Soweit möglich wurde zur weiteren Einschränkung eine Blau-weiß-Selektion durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden auf dem vorbereiteten Platten IPTG und X-Gal (je 40 µl pro Platte) verteilt. Der pGEM®-T-Easy-Vektor besitzt an der Position zur Insertion der zu klonierenden DNA ein Gen, das LacZ-Gen, das für einen Teil der Proteinsequenz der β-Galactosidase kodiert. Mithilfe der bereits in den zur Blau-weiß-Selektion geeigneten E. coli enthaltenen genetischen Information können die Zellen nach Aufnahme des leeren Vektors eine funktionsfähige β-Galactosidase exprimieren. IPTG dient dabei als Induktor der Genexpression. Die Galactosidase spaltet X-Gal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Wurde hingegen Fremd-DNA in den Vektor eingefügt, ist das Leseraster des Gens gestört und es kann keine aktive β-Galaktosidase gebildet werden. Die Bakterienkolonien bleiben weiß. Zur Intensivierung der Blaufärbung konnten die Platten vor dem „Klone-picken“ für 2 h in den Kühlschrank gestellt werden.

Bei der weiteren Untersuchung wurde sich auf die weißen Kolonien konzentriert. Um herauszufinden, ob es sich bei dem Insert um das passende DNA-Fragment handelte, wurden Klon-PCR oder ein Restriktionsverdau nach Minipräparation und eine anschließende Größenbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.10.7 Sequenzierung

DNA-Fragmente mit der richtigen Größe wurden aufgereinigt und zur Sequenzierung zu eurofins geschickt. Entsprechend dem von eurofins zur Verfügung gestellten Protokoll wurden die Proben mit 15 µl DNA (100 ng/µl) und 2 µl Primer (10 pmol/µl) vorbereitet.

2.10.8 Umgang mit kompetenten Zellen und Aufbewahrung der Klone

Die kompetenten Zellen wurden tiefgekühlt bei -80 °C aufbewahrt. Aufgetaute Bakterien wurden von der übrigen Zellkultur ferngehalten. Alle Arbeitsmaterialien und Abfälle wurden nach E. coli-Kontakt autoklaviert. Klone mit in Zukunft weiterhin benötigter Plasmid-DNA konnten für die spätere Vervielfältigung aufbewahrt werden. Dazu wurde eine Über-Nacht-Kultur analog der Vorkultur für die Minipräparation (s. Kap. 2.10.9.1) angelegt. 800 µl davon wurden mit 200 µl sterilem 50 % Glycerol vermischt. Die entstandenen Glycerolstocks wurden ebenfalls bei -80 °C gelagert und konnten jederzeit zur Vermehrung der Plasmid-DNA verwendet werden. Dafür wurde mit einer Impföse in den noch gefrorenen Glycerolstock gestochen und das hängengebliebene Material ausplattiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Stocks unterdessen nicht auftauten, sodass sie für spätere Versuche nutzbar blieben.

2.10.9 Isolation rekombinanter Plasmid-DNA aus Bakterien

2.10.9.1 Minipräparationen

Zur Überprüfung der Plasmide wurden in einer Minipräparation zunächst kleine Mengen an DNA isoliert. Unter Zuhilfenahme einer Impföse wurde eine Einzelkolonie „gepickt“ und in 4-5 ml LB-Medium (versetzt mit 50 µg/ml Ampicillin) gegeben. Die Vorkultur inkubierte über Nacht bei 37,5 °C und 225-250 rpm auf dem Schüttelinkubator. Für die Minipräparation wurden 1,5-2 ml dieser Vorkultur weiterverwendet. Die Isolation der DNA erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers des jeweiligen verwendeten Kits.

2.10.9.2 Maxipräparationen

Entsprach das Ergebnis der Größenkontrolle den Erwartungen, wurden 500 ml LB-Ampicillin-Medium mit 250-500 µl der ersten Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37,5 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Dies diente der Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA durch eine Maxipräparation. Am folgenden Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (4000 U/min, 15 min, 4 °C). Mithilfe eines Plasmid Maxi Kits von

QIAGEN wurden die Zellen alkalisch lysiert und die DNA säulenchromatographisch isoliert und aufgereinigt. Dabei wurde gemäß der Herstellervorgaben vorgegangen und die mitgelieferten Puffer und Anionenaustauscher-Säulen eingesetzt. Die mit Isopropanol ausgefällte DNA wurde nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol in 100 µl deionisiertem Wasser eluiert und bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Alle verwendeten Gefäße, die zuvor nicht steril verpackt waren, wurden vor der Nutzung autoklaviert.

Die aufgereinigte DNA war sofort für Transfektionen bzw. die Sequenzierung einsatzbereit.

2.10.10 Restriktionsverdau

Die Plasmid-Vektoren besitzen eine Sequenz, in der dicht hintereinander die Schnittstellen unterschiedlicher Restriktionsenzyme liegen, die sogenannte Multiple Cloning Site. Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die die DNA an genau definierten Stellen schneiden können. DNA weist stets eine negative Ladung auf und liegt nach einem Restriktionsverdau in linearisierter Form vor, sodass die Laufgeschwindigkeit bei einer Gelelektrophorese nur von ihrer Größe abhängt. Da die Schnittstelle der Endonukleasen und somit die zu erwartende Länge der entstehenden DNA-Stücke bekannt waren, konnte dieses Prinzip zur Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung genutzt werden.

Der Restriktionsverdau wurde außerdem bei der Vermehrung bereits vorhandener Plasmide und zur Vorbereitung weiterer Klonierungsschritte angewandt. Er ermöglichte hierbei, die gewünschten DNA-Fragmente aus der Ursprungs-DNA (z. B. dem Vektor) zu gewinnen.

Das Vorgehen entsprach sich bei beiden Zwecken. Als Ausgangsmaterial diente aus Minipräparationen gewonnene DNA. Für einen Ansatz wurden in der Reihenfolge dH₂O, 5 µl Inkubationspuffer (NEB1.1 oder NEB2.1), 1 µg DNA und zuletzt je 1 µl Enzym pro Restriktionsenzym und µg DNA zusammenpipettiert. Die Wahl des richtigen Puffers erfolgte unter Zuhilfenahme des von NEB zur Verfügung gestellten Double Digest Finders (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>) in Abhängigkeit der jeweiligen Restriktionsenzyme. Es wurde der Puffer gewählt, der zur höchsten Aktivität aller genutzten Enzyme führte. Der Verdau fand bei 37 °C mindestens 1 h lang statt.

2.10.11 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren gemäß ihrer Größe können Gelelektrophoresen eingesetzt werden. Bei linearen Molekülen ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge.

Horizontale Agarose-Gelelektrophoresen kamen sowohl analytisch zur Größenkontrolle der PCR-Produkte bzw. der in Minipräparationen und Restriktionsverdau gewonnenen DNA-Stücke als auch präparativ zur Isolierung dieser zum Einsatz. Es wurden 1,5-2 % Agarose durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 55 °C 4-5 µl Ethidiumbromid darin verteilt. Die Mischung wurde zügig in einen entsprechenden Gelschlitten gegossen. Nach vollständigem Erkalten und damit einhergehendem Erhärten des Gels wurde es in der Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer bedeckt und die Taschen mit Loading Dye versetzten Proben befüllt. Als Marker dienten 7-10 µl Quick Load® Purple 2 Log DNA Ladder (0,1-10 kB). Die Auftrennung der DNA erfolgte elektrophoretisch bei 80 V für 45 min. Im Anschluss konnten die Banden mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, im Molecular Imager®-Chemidoc™XRS oder direkt unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.10.11.1 DNA-Isolierung aus Gelen

Zur Weiterverwendung der DNA kann diese nach einer präparativen Gelelektrophorese aus dem Gel extrahiert werden. Dafür wurde unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm die Bande von Interesse mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte unter Nutzung des Herstellerprotokolls mit dem GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (Roboklon) oder dem QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Die isolierte DNA wurde in 50 µl sterilem dH₂O aufgenommen.

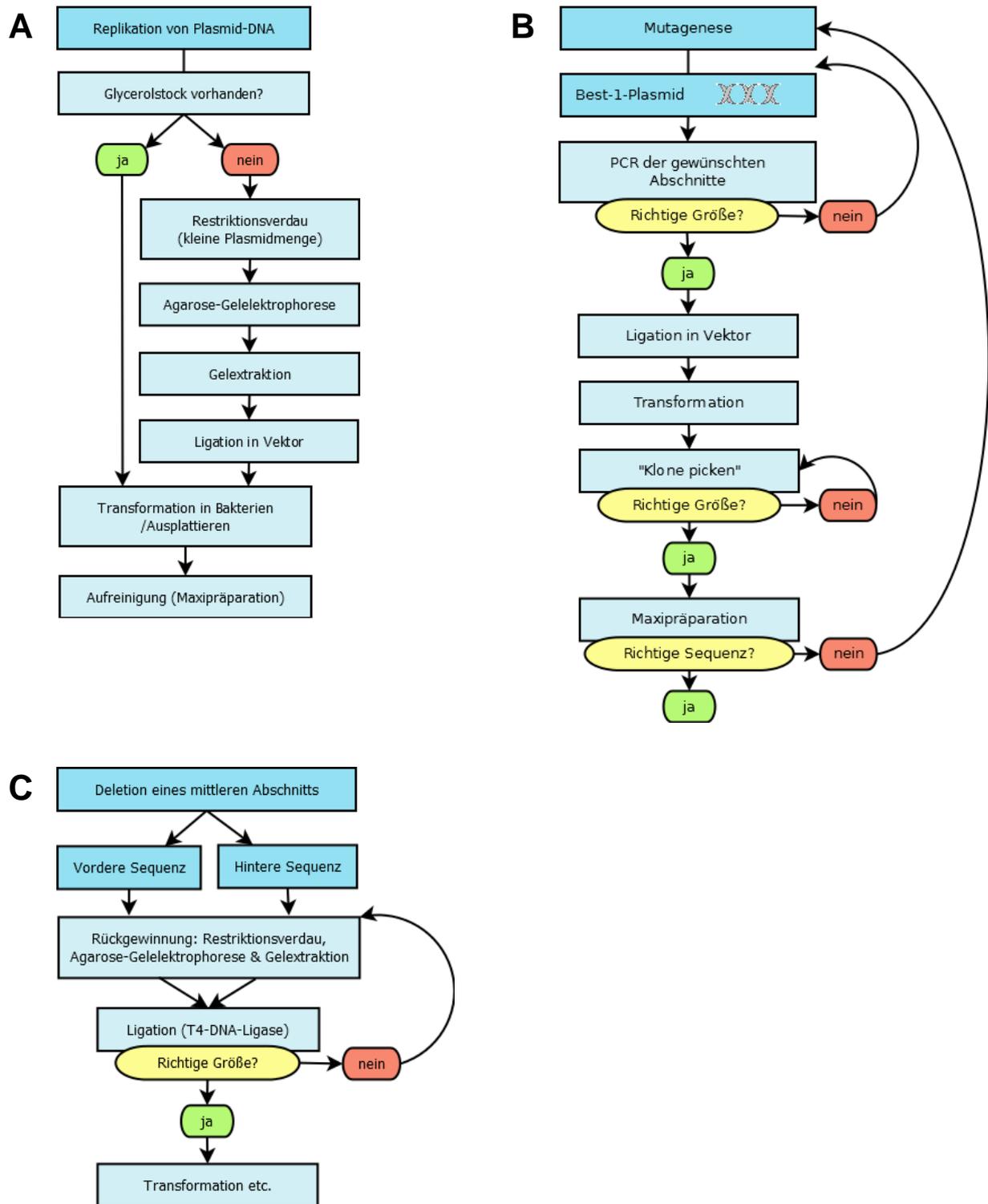


Abb. 2.1: Flussdiagramme zur Vorgehensweise bei Klonierungen. A: Replikation von Plasmid-DNA. **B:** PCR-gesteuerte Mutagenese. **C:** Vorgehen zur Deletion einer mittleren Sequenz. Gewinnung der vorderen und hinteren Teilsequenz durch PCR-gesteuerte Mutagenese wie in B gezeigt.

2.11 Zellkultur und Transfektionen

2.11.1 Allgemeines

Alle im Zusammenhang mit der Zellkultur stehenden Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Um Verunreinigungen vorzubeugen, wurden sterile Einmalartikel genutzt oder die Materialien vor der Verwendung autoklaviert. Nicht sterile Lösungen wurden ebenfalls autoklaviert und ggf. zusätzlich filtersterilisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % in einem Wasserdampf-gesättigten Begasungsbrutschrank.

2.11.2 Zellkultur und Passagieren von Zellen

Verwendet wurden ausschließlich CHO-Zellen, weil hier die Oligomerisation des Bestrophin-1 der RPE-Zellen am ähnlichsten ist. Diese wurden in DMEM/HAM-F12 kultiviert, versetzt mit 10 % FKS und 1 % P/S. Nach dem Auftauen neuer Zellen fanden vor der ersten Transfektion mindestens drei Passagen statt.

Die Zellen wurden maximal zwanzigmal passagiert, bevor sie entsorgt wurden.

Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mittels Inkubation im Brutschrank mit Trypsin-EDTA vom Gefäßboden abgelöst. Nach etwa 2 min wurde die toxische Trypsinwirkung durch Zugabe von Nährmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Tube überführt und während 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und in einer neuen Zellkulturflasche im Brutschrank kultiviert.

Im Mittel wurden die Zellen alle drei Tage passagiert. Bei einem längeren Intervall zwischen den Passagen wurde nach drei Tagen das Nährmedium gewechselt, indem drei Viertel des alten durch neues Medium ersetzt wurden.

2.11.2.1 Transfektion

In den Experimenten wurden heterolog exprimierte Proteine untersucht. Transfiziert wurde jeweils eine Kombination aus zwei Plasmiden, die für His-getaggttes Rab27a einerseits und für den Bestrophin-1-Wt beziehungsweise die zu untersuchende Bestrophin-Mutante andererseits kodierten. Die Mutanten hBest1 F305S und T6P

wurden auch gemeinsam mit dem Bestrophin-1-Wt transfiziert, um die Konstellation bei autosomal-dominanter Vererbung nachzustellen.

In Vorbereitung der Transfektionen für Koimmunpräzipitationen wurden die Zellen bei einem Passagievorgang nicht in Flaschen, sondern in größerer Menge (etwa 5 ml der neuen Zell-Nährmedium-Suspension) in 100 mm Petrischalen gegeben. Sollte eine Immunhistochemie durchgeführt werden, wurden mit 12- oder 15-mm-Deckgläsern bestückte 12-Loch-Zellkulturplatten verwendet.

Die Transfektion erfolgte 12-24 h nach der Aussaat. Die Zellen sollten zu diesem Zeitpunkt eine Konfluenz von 70-80 % erreicht haben. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamine 2000 im Verhältnis von Reagenz zu DNA 1,5-2 : 1. Das kationische Reagenz ermöglicht der negativ geladenen Plasmid-DNA durch Komplexbildung und einer somit insgesamt positiveren Ladung die Passage in die Zellen. Pro 100-mm-Petrischale und Plasmid wurden 6 µg DNA verbraucht, für die Immunzytochemie waren es 0,5 µg pro Vertiefung einer 12-Loch-Platte. Nach 5-minütiger Inkubation des Transfektionsreagenz und der Plasmid-DNA mit je 100 µl beziehungsweise 1000 µl des Mediums Opti-MEM® in separaten Eppendorfgefäßen wurde beides zusammengegeben. Bei Raumtemperatur inkubierte das Gemisch weitere 5-20 min, bevor es schließlich auf die Zellen gegeben wurde.

2.12 Koimmunpräzipitation

2.12.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Koimmunpräzipitation (oder indirekte Immunpräzipitation, IP) ist eine gängige Methode, um Protein/Protein-Interaktionen aufzudecken. Ein Zelllysate wird zu einer stationären Phase, in der Regel Agarosekügelchen, gegeben, die wiederum aufgrund eigener Affinität oder mithilfe eines gekoppelten Antikörpers an eines der zu untersuchenden Proteine binden. Aufgrund der hohen Masse der Kügelchen (Beads) kann der entstandene Komplex per Zentrifugation aus dem übrigen Lysat ausgefällt werden. Dabei werden auch etwaige Interaktionspartner des Proteins präzipitiert, da Protein/Protein-Interaktionen in mehr oder weniger stabilen Bindungen resultieren. Die Methode wird indirekt genannt, wenn das Präzipitat im Anschluss nicht auf das eigentliche Antigen, sondern auf das Vorhandensein des vermuteten Interaktionspartners hin untersucht wird. Finden sich in diesem Komplex assoziierte Proteine, geht man davon

aus, dass sie in der Zelle zuvor eine funktionelle Einheit gebildet haben. Es gilt jedoch zu bedenken, dass es sich dabei lediglich um eine Annahme handelt.

2.12.2 Aufbereitung der Zelllysate

Etwa 36 h nach der Transfektion konnten die Zellen geerntet werden. Hierzu wurde zuerst überflüssiges Nährmedium entfernt und die Petrischale einmal mit kaltem PBS gespült. Nach der Zugabe von 0,5 ml Lysispuffer wurden die am Boden haftenden Zellen unter Eiskühlung des Gefäßes vorsichtig mit einem sterilen Zellschaber geerntet. In den weitaus häufigeren Fällen sollte die Koimmunpräzipitation gegen Rab27a ausgeführt werden. In diesen Fällen wurde der Lysispuffer für die Cobalt-Beads verwendet. Die Cobalt-Beads binden spezifisch an Histidin-Tags entsprechend markierter Proteine und wurden im vorliegenden Fall zur Detektion des His-getaggen Rab27a eingesetzt. Sollte eine Immunpräzipitation gegen Bestrophin-1 stattfinden, fanden Protein G-Beads und Rosenthal-Puffer Verwendung. Letzterer wurde frisch mit pankreatischem Trypsin-Inhibitor Aprotinin im Verhältnis 1 : 1000 (Aprotinin : Lysispuffer) und Phenylisocyanat (PIC) 1 : 100 versetzt. Als Proteaseinhibitor dienten Roche Complete Mini Tabletten.

Das Zell-Lysispuffer-Gemisch wurde beim Resuspendieren möglichst homogenisiert und in 2 ml Eppendorfgefäßen 20 min auf dem Schüttler im Kühlraum belassen. Anschließend wurde es für 20 weitere min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert.

In den Reaktionsgefäßen war daraufhin unten ein Pellet mit großen Zellresten zu erkennen, das verworfen wurde. In einer klaren, wässrigen Phase darüber befand sich das Lysat, dessen Proteinkonzentration im NanoDrop 2000 gemessen wurde. Hierbei sollte eine Konzentration von mindestens 1 mg/ml erreicht werden.

100 µl des Lysats wurden bei -20 °C für folgende Schritte aufbewahrt (L).

Der verbliebene Überstand wurde auf jeweils 50 µl Cobalt-Beads oder eine zuvor vorbereitete Mischung aus 50 µl Protein G-Beads plus 7 µl Bestrophin-1-Antikörper pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Überkopf-Schüttler.

In einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt wurden am folgenden Tag die Proteine, die an die Beads gebunden hatten (Pellet), von den übrigen getrennt (Überstand). Von der nicht gebundenen Fraktion (not bound, **NB**) wurden wiederum 100 µl aufbewahrt, der Rest verworfen. Das die Beads enthaltende Pellet wurde in 3-4 Waschschritten mithilfe des jeweiligen Waschpuffers (mit einem Volumen von etwa 0,8-1 ml) weiter aufbereitet.

Zentrifugiert wurde stets bei 4 °C mit 1000-1200 g. Beim letzten Waschvorgang wurden nur 100 µl inklusive der Beads belassen (**IP**).

Das aus einer Zellyse gewonnene Präzipitat **IP**, das dazugehörige Zellysate **L** und der nicht gebundene Zellüberstand **NB** bildeten ein Proben-Triplett für die nachfolgenden Experimente, die den Ablauf, Erfolg oder Misserfolg der Präzipitation dokumentieren. Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde zu jeder der drei zusammengehörenden Proben als Probenpuffer Vierfach-Laemmli und im Verhältnis 10 : 1 dazu β-Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken gegeben, sodass die Proteine in ihrer Primärstruktur vorlagen. Die **IP**-Probe mit den Cobalt-Beads wurde zusätzlich mit 150 mM Imidazol versetzt. Um eine Dissoziation der Proteinkomplexe von den Beads zu bewirken, wurden die Proben daraufhin für 3 min bei 90 °C erhitzt. Nach diesem Schritt konnten sie entweder bei -20 °C für einen späteren Zeitpunkt aufbewahrt oder direkt ein Gel damit beladen werden.

2.12.3 SDS-PAGE

2.12.3.1 Theoretische Grundlagen

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Die diskontinuierliche Gelelektrophorese beruht auf einem System aus zwei verschiedenen Gelen, wobei das dünnere Sammelgel über dem Trenngel liegt. Die Gele unterscheiden sich in Porengröße und pH-Wert (deshalb „diskontinuierlich“). Bei Anlegen eines elektrischen Stroms werden die Proteine im großporigen Sammelgel derart konzentriert, dass sie gleichzeitig ins Trenngel eintreten. Bei Durchlaufen des deutlich kleinporigen Trenngels beginnen die Proteine dann, sich nach ihrer Größe aufzutrennen. Kleinere Proteine migrieren hierbei schneller in Richtung der Anode.

Die Mobilität der Moleküle ist eine Funktion der Länge, Konformation und Ladung dieser. Bei der Methode nach Laemmli dient zusätzlich Natriumdodecylsulfat (SDS) dazu, durch Linearisierung und Überdeckung der Eigenladung der Proteine eine Auftrennung dieser zu ermöglichen, die fast ausschließlich auf ihrer Größe beruht.

2.12.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Für die Detektion von Bestrophin-1 mit seinem Molekulargewicht von 67-68 kDa erwiesen sich 1,5 mm dicke Gele mit 10-12 % Acrylamid im Trenngel als geeignet. Das Sammelgel

enthielt 5 % Acrylamid. In die Taschen des Gels wurden nacheinander jeweils 30 µl **NB**, **IP** und **L** pipettiert, sodass sie später auf der Membran in umgekehrter Reihenfolge zu liegen kamen. Als Größenreferenz dienten in einer zusätzlichen Tasche 5-10 µl Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa) oder Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa). Die Proben wurden in der mit Laufpuffer befüllten Kammer in den ersten 15 min bei 80 mA und anschließend bei 60 mA Stromstärke so lange aufgetrennt, bis der Farbstoff des Probenpuffers das Gel vom Minus- zum Pluspol durchwandert hatte. Alternativ wurden konstant 200 V Spannung angelegt.

2.12.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen, die zuvor 5 s in Methanol aktiviert wurde. Hierzu wurde an die mit Transferpuffer befüllte Kammer 150 min lang entweder eine konstante Stromstärke von 250 mA oder 1 h eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Der Transferpuffer wurde zuvor gekühlt und die Mini-PROTEAN® Tetra Cell Kammer auf Eis gestellt.

Unspezifische freie Proteinbindungsstellen wurden über Nacht, mindestens aber für 1 h in 5 %iger Milchlösung (in 0,05 %-TBST) blockiert, bevor die Membran mit einer Lösung aus primärem Antikörper und 0,05 %-TBST entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum inkubierte. Nach dreimaligem Waschvorgang mit 0,05 %-TBST, um nicht gebundene Antikörper-Überstände zu entfernen, wurde für 1 h der jeweilige Meerrettichperoxidase (HRP)-gebundene, Spezies-spezifische sekundäre Antikörper dazugegeben (ebenfalls verdünnt in 0,05 %-TBST). Genau wie zuvor wurde die Membran im Anschluss gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit Detektionsreagenz, woraufhin Antikörper-bindende Proteine mittels Chemilumineszenz im Molecular Imager®-ChemiDoc™XRS sichtbar gemacht werden konnten. Die Bilder wurden mithilfe von QuantityOne-Software (Bio-Rad) ausgewertet und bearbeitet.

Membranen konnten im Anschluss erneut mit einem anderen Antikörper behandelt und eingefärbt werden. Dazu wurden sie mithilfe des Restore™ Western Blot Stripping Buffer 5-15 min gewaschen und erneut geblockt.

2.13 Immunzytochemie

Die zu färbenden Zellen wurden wie unter dem Abschnitt zur Transfektion beschrieben auf Deckgläsern in 12-Loch-Platten im Brutschrank angezüchtet. Bei Erreichen der

Konfluenz, in der Regel etwa 1,5 bis 2 Tage nach Transfektion, wurden sie nach vorsichtigem Abpipettieren des Nährmediums 10 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Vor Zugabe der primären Antikörper folgte ein mehrfacher Waschvorgang mit TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) (dreimal 5 min) und die Blockade unspezifischer Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation in 5 % bovinen Serumalbumin (BSA). Die Inkubation mit den primären Antikörpern, gelöst in 0,8 % BSA in TBS, erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach wiederholtem Waschen mit TBS wurden am folgenden Tag die Fluoreszenz-markierten Spezies-spezifischen sekundären Antikörper (in TBS mit 0,8 % BSA) für 1 h hinzugegeben. Um die Fluoreszenzfähigkeit für die Detektion möglichst vollständig zu erhalten, erfolgten dieser Schritt sowie alle weiteren in einem abgedunkelten Raum. Die Zellen wurden wiederum dreimal mit TBS gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurde für 5 bis 10 min DAPI hinzugegeben.

Mithilfe eines Tropfens Dako Fluorescent Mounting Medium wurden die Deckgläser abschließend luftblasenfrei mit der zellbedeckten Seite nach unten auf Objektträger aufgebracht. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die fertigen Objektträger wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und vor dem Mikroskopieren mindestens 2 h vollständig aushärten gelassen.

Die Betrachtung der Zellen und Aufnahme der Bilder fand unter einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss) mit ZEN-Software statt.

2.14 Auswertung der Daten und statistische Analyse

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Western Blots wurden ausgewertet, indem die Proteinbanden in einer densitometrischen Analyse mit QuantityOne-Software quantifiziert und verglichen wurden. Hierzu wurde die Intensität der jeweils zu untersuchenden Bande im Präzipitat ins Verhältnis zu derjenigen des Lysats gesetzt. Ein Wert von 1 würde dementsprechend bedeuten, dass sich in beiden Proben genau gleich viel Protein befindet. Konfokale Aufnahmen von immunzytochemischen Färbungen wurden mit ImageJ analysiert. Zur Beurteilung der Kolo-kalisation wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (Pearson's Correlation Coefficient, PCC) ermittelt, eine der Standardtechniken zur Korrelation zweier Bilder. Der PCC basiert nur auf Ähnlichkeiten in der Form und lässt Intensitätswerte außer Acht. Er kann Werte zwischen -1 bis 1 annehmen, wobei -1 keinerlei Überlappung und 1 eine vollständige Kolo-kalisation bedeutet.

Es wurden jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler (standard error of the mean, SEM) angegeben. Zur Testung der statistischen Signifikanz wurden ungepaarte student'sche t-Tests durchgeführt, wobei eine Signifikanz bei p-Werten unter 0,05 angenommen wurde. p-Werte $< 0,05$ wurden mit einem einfachen Asteriskus (*), $p < 0,01$ mit einem zweifachen (**) und $p < 0,001$ mit einem dreifachen Asteriskus (***) erkenntlich gemacht. n bezieht sich auf die Anzahl der Experimente. In den Abbildungen werden repräsentative Experimente gezeigt.

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollversuche

Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurden zur Testung der verwendeten Plasmide und der Eignung des Expressionssystems verschiedene Kontrollversuche durchgeführt.

3.1.1 Endogene Expression und Antikörperspezifität

Zum Ausschluss einer endogenen Expression der Zielproteine wurden Lysate untransfizierter Zellen mittels Gelelektrophorese und Western Blot (WB) aufgetrennt und gegen Bestrophin-1 und Rab27a gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass in den genutzten CHO-Zellen keine Eigenexpression dieser Proteine stattfindet (Abb. 3.1A/B), sodass die Expression genau kontrolliert werden konnte. In einer Färbung gegen His konnte außerdem eine unspezifische Reaktivität von Zellbestandteilen in Abwesenheit von Rab27a mit His-tag mit den Cobalt-Beads ausgeschlossen werden (Abb. 3.1C). Als Positivkontrolle diente His-markiertes Rab27a für die Färbungen gegen Rab und His respektive Bestrophin-1-Wt für die Färbung gegen Bestrophin. Erwartungsgemäß liegt die Bande für Bestrophin-1 bei 67 kDa, während Rab27a ein Molekulargewicht von 27 kDa aufweist (plus etwa 1 kDa für den His-Tag). Auf diese Weise wurden auch neue Antikörper an untransfizierten und an einfach transfizierten Zellen, bei denen der erwartete Effekt bekannt war, getestet (nicht gezeigt).

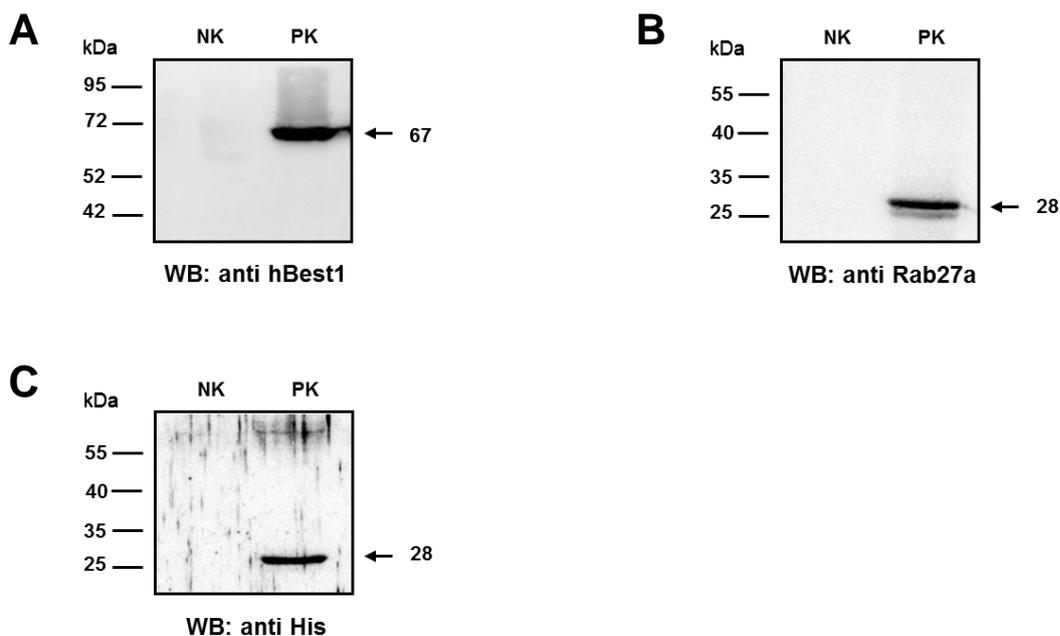


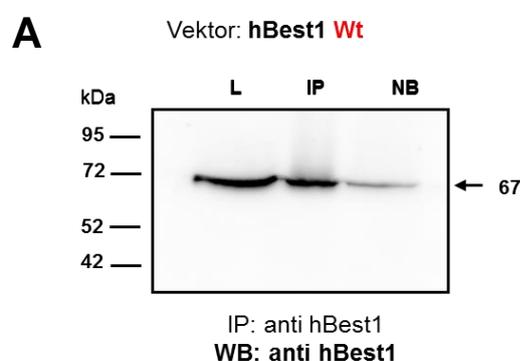
Abb. 3.1: Expressionssystemkontrollen. **A:** Untransfizierte CHO-Zellen (**NK**) wurden im Western Blot gegen Bestrophin gefärbt. Als Positivkontrolle dient Lysat von mit Bestrophin-1-Wt transfizierten Zellen (Bestrophin-1: 67 kDa). **B:** Untransfizierte CHO-Zellen (**NK**), gefärbt gegen Rab27a. Als Positivkontrolle dienen mit Rab27a-His-tag einfachtransfizierte Zellen (28 kDa). **C:** Untransfizierte Zellen, gefärbt gegen His (**NK**). Als Positivkontrolle dienen mit His-markiertem Rab27a transfizierte Zellen. (**NK** = Negativkontrolle, **PK** = Positivkontrolle)

3.1.2 Immunpräzipitationskontrollen

3.1.2.1 Protokolle und Präzipitationseffizienz

Zur Etablierung des richtigen Protokolls für die Verwendung von Protein G-Agarose- und Cobalt-Beads wurden Zelllysate einfach transfizierter Zellen verwendet. Zur Testung der Protein G-Beads wurden die Beads mit Bestrophin-1-Antikörper versetzt und an Bestrophin-haltigen Lysaten eine Immunpräzipitation durchgeführt, wobei sich 7 µl unverdünnter Antikörper als geeignete Menge erwiesen. Die Membran aus dem im Anschluss durchgeführten Western Blot wurde gegen Bestrophin-1 gefärbt (Abb. 3.2A).

Mit den Cobalt-Beads wurde gleichermaßen verfahren, mit dem Unterschied, dass statt Bestrophin His-markiertes Rab27a zum Einsatz kam und den Beads keine Antikörper beigegeben werden mussten. Für die Cobalt-Beads wurden zwei Protokolle im Vergleich getestet, bei denen sich die Koimmunpräzipitationseffizienz erheblich unterschied. Bei Verwendung des Protokolls, das auch später genutzt wurde, blieb in der nicht gebundenen Fraktion kaum Rab27a zurück (Abb. 3.2B). Das Vorgehen war dabei analog zur Beschreibung im Material- und Methodenteil (s. Kap. 2.12.2). Das zweite getestete Protokoll entsprach dem, welches Thermo Fisher Scientific für die Verwendung der Cobalt-Beads zur Verfügung stellt (Abb. 3.2C).



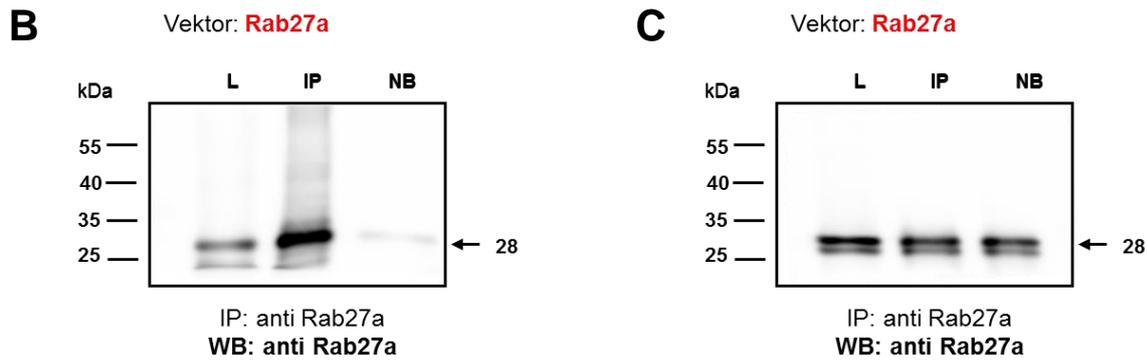


Abb. 3.2: Etablierung der Immunpräzipitationsprotokolle. **A:** CHO-Zellen wurden mit Bestrophin-1-Wt transfiziert. Zur Etablierung des Protokolls erfolgten Immunpräzipitation und Western Blot beide gegen Bestrophin-1 (67 kDa). **B und C:** CHO-Zellen wurden mit Rab27a transfiziert. Mithilfe von Cobalt-Beads wurde die Immunpräzipitation in beiden Fällen gegen Rab27a bzw. gegen den His-Tag durchgeführt, der Western Blot ebenfalls gegen Rab27a. Vergleich zweier Immunpräzipitationsprotokolle mit unterschiedlicher Präzipitationseffizienz. (**L** = Lysat, **IP** = Immunpräzipitat, **NB** = nicht gebundene Fraktion)

3.1.2.2 Artefakte der Koimmunpräzipitation

Indem die Versuche zur Detektierung einer Interaktion zwischen Rab27a und dem Bestrophin-1-Wt in beide Richtungen durchgeführt wurden, sollte die Gefahr falsch positiver Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindungsreaktionen verringert werden. Hierbei gelang der Nachweis, dass sowohl Bestrophin-1 bei der Präzipitation von Rab27a kopräzipitiert als auch umgekehrt Rab27a mit Bestrophin-1 (s. Kap. 3.2). Darüber hinaus wurde die Proteinexpression immunhistochemisch an intakten CHO-Zellen untersucht, um durch Kompartimentierungsverlust entstehende Artefakte auszuschließen. Alle Experimente wurden mehrfach wiederholt.

3.1.3 Kontrollen für zelluläre Immunhistochemie

Zur besseren Bestimmbarkeit der subzellulären Lokalisation der transfizierten Proteine und zur Abgrenzung der Zellmembran vom Zytosol wurden native CHO-Zellen gegen $\alpha 5\beta 1$ -Integrin gefärbt (Abb. 3.3). Dabei handelt es sich um ein fest verankertes Transmembranprotein, das überall in den Zellmembranen vorkommt. Integrin-Antikörper sind demnach geeignet, um die Zellmembranen sichtbar zu machen. Die Aufnahmen dienen dem Vergleich, um die Position der anderen, zu untersuchenden Proteine besser einschätzen zu können.

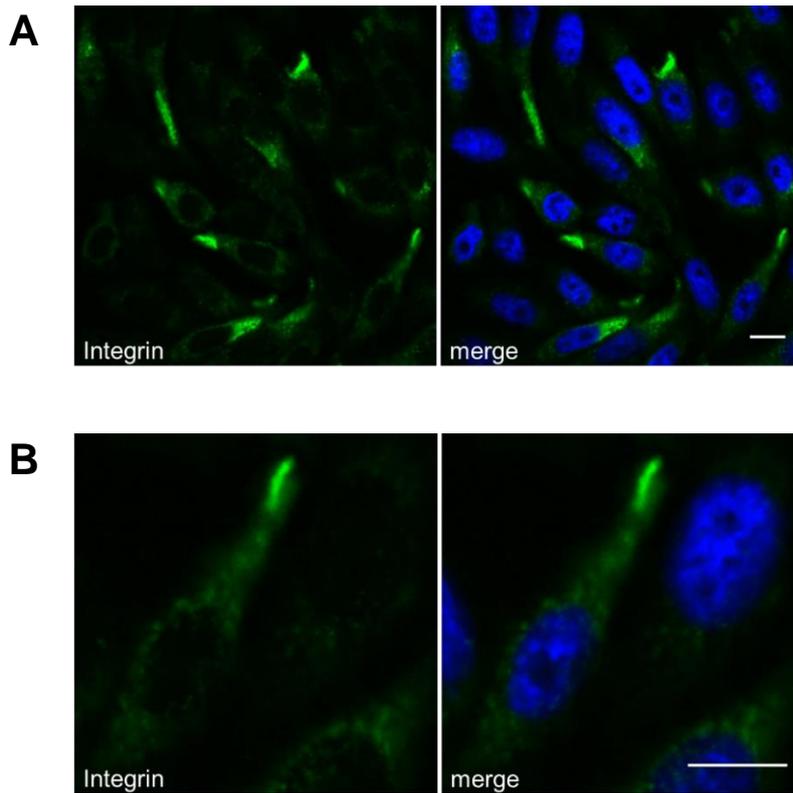


Abb. 3.3: Färbung von Integrin zur Visualisierung der Zellmembranen. A und B: Untransfizierte CHO-Zellen wurden durch Antikörperfärbung des Membranbestandteils Integrin (grün) sichtbar gemacht. Im zweiten Bild sind zusätzlich die Zellkerne durch DAPI blau gefärbt. Maßstab: 10 μ m.

3.2 Rab27a und Bestrophin-1-Wt interagieren

Zunächst wurde der Bestrophin-1-Wt auf eine Protein/Protein-Interaktion mit Rab27a untersucht, indem an CHO-Zellen, die heterolog Rab27a-His-Tag (Rab27a pCDNA3.1 (+)6xHis) und den Bestrophin-1-Wt (hBest1wt pCDNA3) exprimierten, Koimmunpräzitationen durchgeführt wurden. Zu diesem Zweck wurden Zelllysate vorbereitet und Cobalt-Beads, die an His-Tags binden, respektive Antikörper-gekoppelte Agarose-Beads eingesetzt. Dabei war die Immunpräzitation primär entweder gegen Rab27a oder Bestrophin-1 gerichtet, wobei das jeweils andere Protein anschließend im Western Blot angefärbt wurde. Im Präzipitat der Immunpräzitation gegen Rab27a war stets Bestrophin-1 nachweisbar und umgekehrt (Abb. 3.4). Es zeigte sich also in beiden Fällen, dass eine Bindung zwischen den zwei Proteinen stattgefunden hatte.

Der Versuch unter dem Einsatz von Cobalt-Beads wurde fünfmal wiederholt und quantitativ ausgewertet. Für den Bestrophin-1-Wt ergab sich aus allen aufgenommenen

und auswertbaren Bildern ein Mittelwert von $1,86 \pm 0,27$ ($n = 5$) (**IP** : **L**). Dieser Wert diente als Referenz für die Bewertung der nachfolgenden Versuche mit mutanten Bestrophin-1-Formen. In der nicht gebundenen Fraktion (**NB**) ließ sich eine entsprechende Bande lediglich erahnen, was für eine sehr gute Koimmunpräzipitation beziehungsweise eine starke Bindung des Bestrophin-1-Wt an Rab27a spricht.

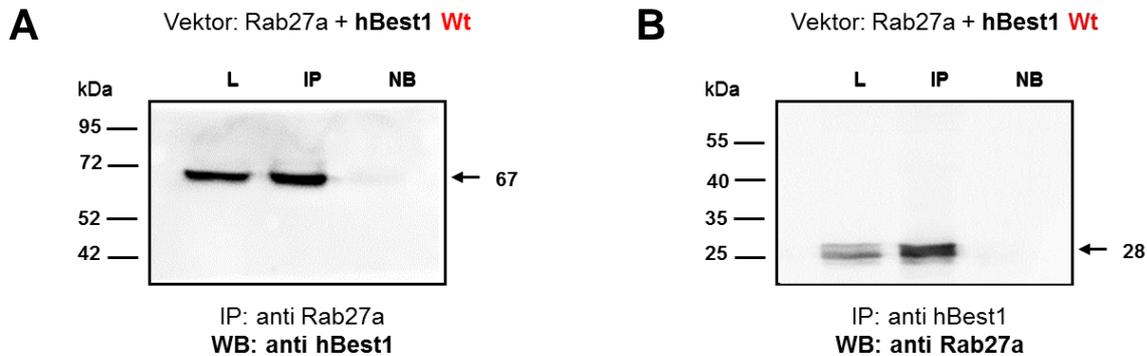


Abb. 3.4: Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1-Wt. CHO-Zellen wurden mit Rab27a und Bestrophin-1-Wt transfiziert. **A:** Rab27a wurde mithilfe von Cobalt-Beads ausgefällt und die präzipitierten Proteine im Western Blot mit Antikörpern gegen Bestrophin-1 (67 kDa) gefärbt. **IP**-Banden bei 67 kDa sprechen für eine physikalische Interaktion von Bestrophin-1 mit Rab27a. **B:** Bestrophin-1 wurde mit Anti-Bestrophin-1-Antikörpern und Agarose-Beads immunpräzipitiert, gefärbt wurde gegen Rab27a (His-markiert 28 kDa). Wiederum war eine Koimmunpräzipitation nachweisbar. (**L** = Lysat, **IP** = Immunpräzipitat, **NB** = nicht gebundene Fraktion)

Die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine wurde mittels Immunzytochemie in transfizierten CHO-Zellen analysiert. Das diente zugleich dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse der Immunpräzipitationen durch Kompartimentierungsverlust der Zellen während der Lyse. Sowohl Rab27a als auch wildtypisches Bestrophin-1 fanden sich kolokalisiert im Bereich der Zellmembran (Abb. 3.5). Dies resultierte in einem PCC von $0,77 \pm 0,02$ ($n = 15$). Eine direkte oder indirekte Wechselwirkung kann somit tatsächlich stattfinden.

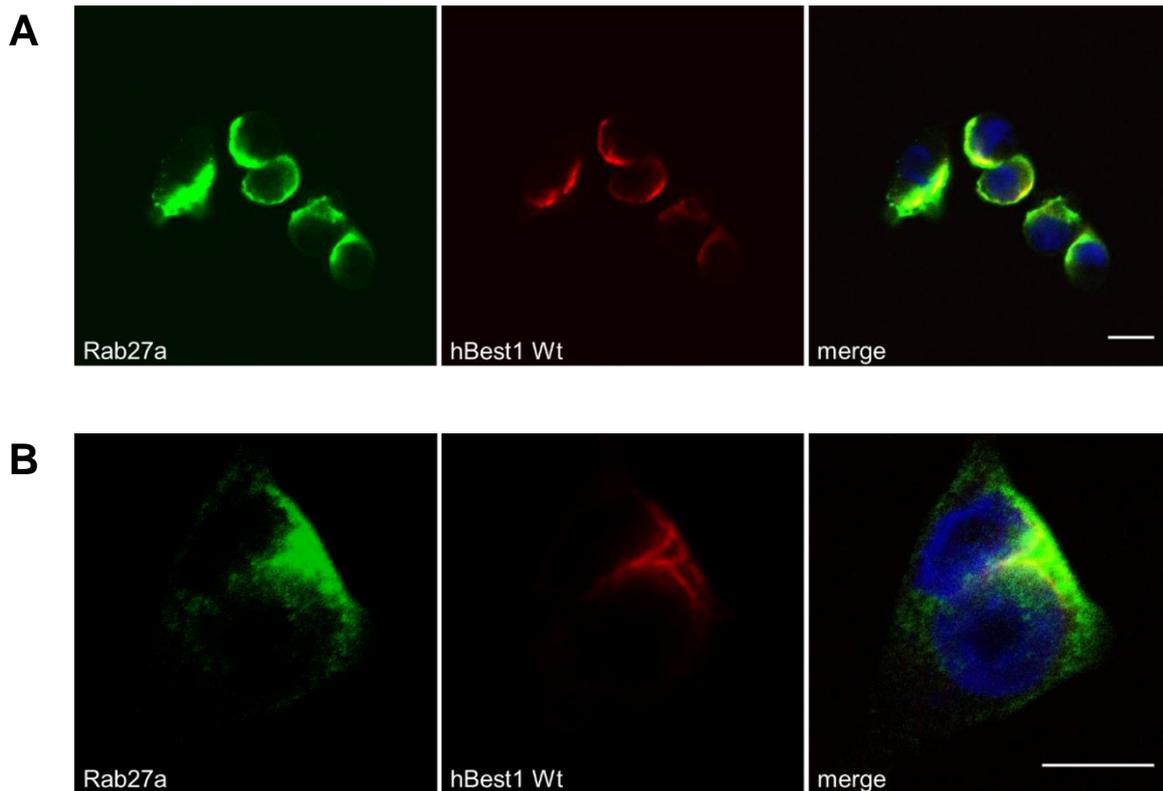
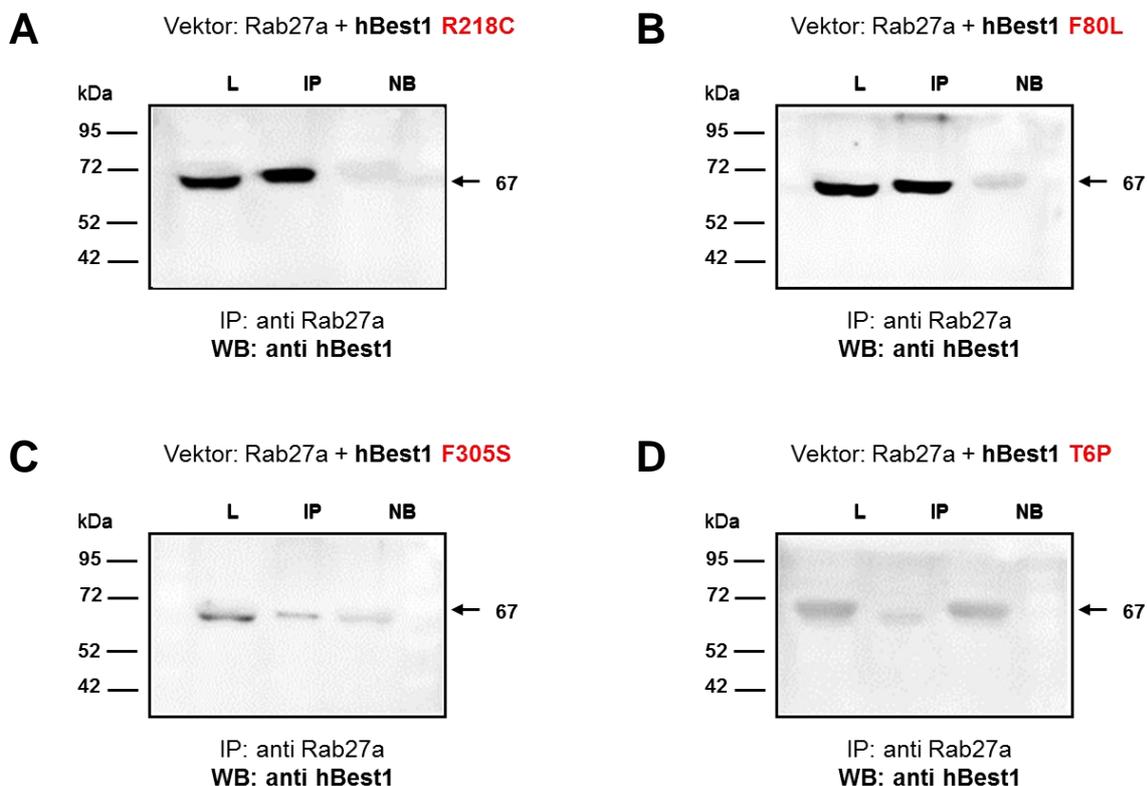


Abb. 3.5: Subzelluläre Lokalisation von Rab27a und Bestrophin-1-Wt. A und B: CHO-Zellen wurden mit Rab27a (grün) und Bestrophin-1-Wt (rot) transfiziert. Gelbe Färbung in Überlagerungsbildern indiziert eine Kolokalisation der beiden Proteine. Zellkerne stellen sich blau dar. Maßstab: 10 μ m.

3.3 Abgeschwächte Interaktion zwischen Rab27a und krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten

Um der Frage nachzugehen, ob Rab27a eine Rolle in der Pathogenese der Best'schen vitelliformen Makuladystrophie spielt, wurden CHO-Zellen mit Rab27a und einer von vier krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten kotransfiziert und durch Koimmunpräzipitation und Western Blot auf das Auftreten einer physikalischen Interaktion untersucht. Bei den Mutanten handelte es sich allesamt um Missense-Mutanten, die durch eine Punktmutation zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen und deren Vorkommen bei BVMD-Patienten beschrieben ist (BEST1 Database, 2017). Es wurden die Mutanten hBest1F305S, F80L, R218C und T6P getestet. Koimmunpräzipitation wurde als stattgehabte Interaktion gedeutet. Die Effizienz der Koimmunpräzipitation und somit der Bindung wurde mit der Bindungseffizienz des Bestrophin-1-Wt verglichen und in Relation dazu gestellt.

Die Präzipitation von Rab27a führte stets zu einer Koimmunpräzipitation mit Bestrophin-1, die aber je nach Mutante unterschiedlich stark ausfiel (Abb. 3.6). Starke Banden in der **IP** sprechen für eine starke Interaktion, während kräftige **NB**-Banden in Verbindung mit schwachen **IP**-Banden eher das Gegenteil bedeuten. Die Bestrophin-1-Mutante R218C zeigte mit Rab27a eine Interaktion, die sich bei einem **IP** : **L**-Verhältnis von $1,35 \pm 0,07$ ($n = 5$) in ihrer Ausprägung nicht signifikant von derjenigen zwischen dem Rab-Protein und dem Bestrophin-1-Wt unterschied ($p = 0,13$). F80L bewegte sich im Mittelfeld der untersuchten Mutanten, mit einer relativen Intensität der **IP**-Bande von $0,86 \pm 0,13$ ($n = 3$) von der Intensität der Bestrophin-1-Bande im Lysat, wohingegen bei den beiden übrigen Punktmutanten bei 67 kDa nur sehr schwach ausgeprägte Banden detekrierbar waren. Die relative Intensität (**IP** : **L**) der Bande nach Transfektion von Bestrophin-1-F305S entsprach $0,33 \pm 0,12$ ($n = 3$), diejenige bei Bestrophin-1-T6P sogar nur $0,24 \pm 0,12$ ($n = 3$). Bei Bestrophin-1-F80L betrug die Effizienz der Koimmunpräzipitation demnach noch 46 % von der des Wildtyps, bei Bestrophin-1-F305S waren es 18 % und bei Bestrophin-1-T6P 13 %. Somit fand bei jeder der Mutanten zwar noch eine Protein/Protein-Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1 statt, diese war jedoch außer bei R218C signifikant geringer als beim Wildtyp, was auf eine reduzierte Bindungsaffinität hinweist.



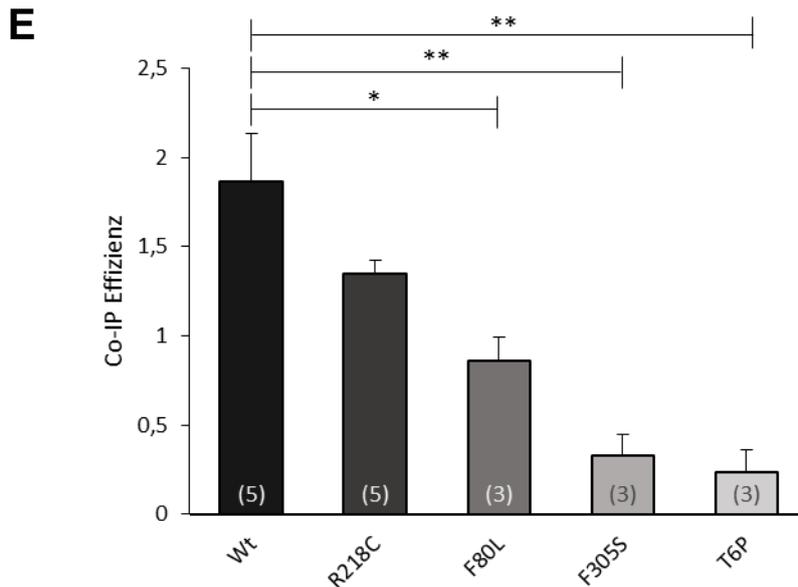


Abb. 3.6: Interaktion zwischen Rab27a und krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten. CHO-Zellen wurden mit Rab27a und jeweils einer Bestrophin-1-Mutante transfiziert. Es wurde Rab27a präzipitiert und im Western Blot gegen Bestrophin-1 (67 kDa) gefärbt. (**L** = Lysat, **IP** = Immunpräzipitat, **NB** = nicht gebundene Fraktion) **A:** Koimmunpräzipitation von Bestrophin-1 nach Transfektion der Bestrophin-1-Mutante R218C. **B:** Koimmunpräzipitation nach Transfektion von F80L. **C:** Koimmunpräzipitation nach Transfektion von F305S. **D:** Koimmunpräzipitation nach Transfektion von T6P. **E:** Zur Quantifizierung der Effizienz der Koimmunpräzipitationen wurde das Verhältnis zwischen Intensität der Bande in der **IP** und Intensität der Bande im Lysat gebildet (**IP : L**). (Daten gegeben als Mittelwert \pm SEM; n = 3-5) Bewertung der Signifikanz der Abweichung gegenüber der wildtypischen Effizienz. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

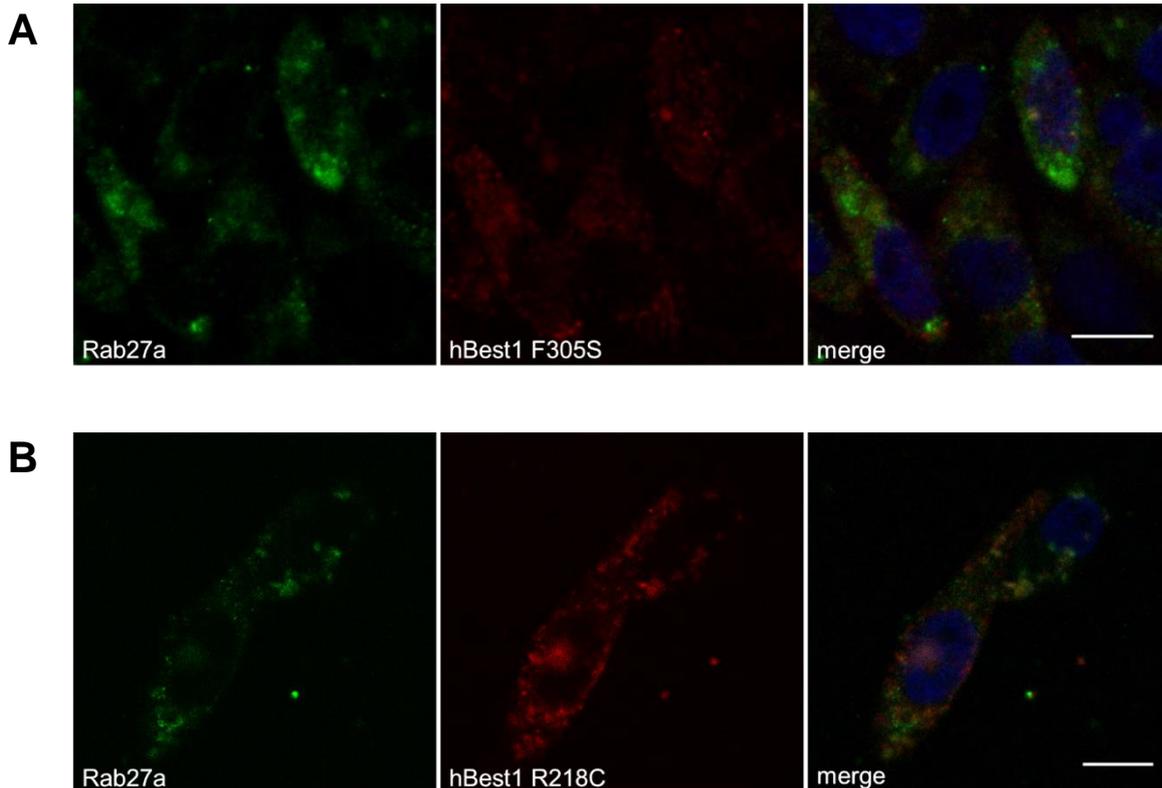
Unterstützend zu diesen Beobachtungen wurde anschließend in identisch transfizierten Zellen mithilfe von Immunzytochemie die Lokalisation der Bestrophin-Mutanten und deren Kolokalisation mit Rab27a analysiert (Abb. 3.7).

Das Verteilungsmuster der mutanten Bestrophine war insgesamt etwas heterogener als beim Bestrophin-1-Wt. Bestrophin-1-R218C entsprach in optischer Kontrolle weitestgehend dem Bestrophin-1-Wt. Auch Bestrophin-1-F305S zeigte sich wie der Bestrophin-1-Wt hauptsächlich peripher und dabei nur ein wenig unregelmäßiger verteilt als dieser (Vgl. Abb. 3.5) und lieferte insgesamt ein Bild, das der wildtypischen Verteilung ähnlich sah. Demgegenüber war die Mutante Bestrophin-1-T6P mitunter zytosolisch lokalisiert, teilweise jedoch auch in der Peripherie. Bestrophin-1-F80L fand sich ebenfalls

in der Zellmembran oder Membrannähe, lag jedoch ungleichmäßig verteilt und stellenweise gehäuft vor und ähnelte damit der Verteilung von F305S.

Soweit optisch zu beurteilen, beeinflusste die veränderte Lokalisation von Bestrophin-1 nicht die subzelluläre Lokalisation von Rab27a.

Die Aufnahmen von Rab27a und Bestrophin-1 wurden in einem dritten Bild überlagert, überlappende Fluoreszenz kennzeichnete dabei eine Kolo­kalisierung der Proteine. Zur Quantifizierung wurde für jede Mutante der PCC berechnet. Für Bestrophin-1-F305S, R218C und T6P ergaben sich hierbei sehr ähnliche Werte. Der PCC für F305S lag bei $0,65 \pm 0,02$, der für R218C bei $0,63 \pm 0,03$ und für T6P war er $0,61 \pm 0,02$. F80L kolokalisierte deutlich weniger, was sich in einem PCC von nur $0,49 \pm 0,04$ bemerkbar machte. Alle Mutanten unterschieden sich demnach diesbezüglich signifikant vom Wildtyp. Es wurden 20 Zellen pro Mutante ausgewertet.



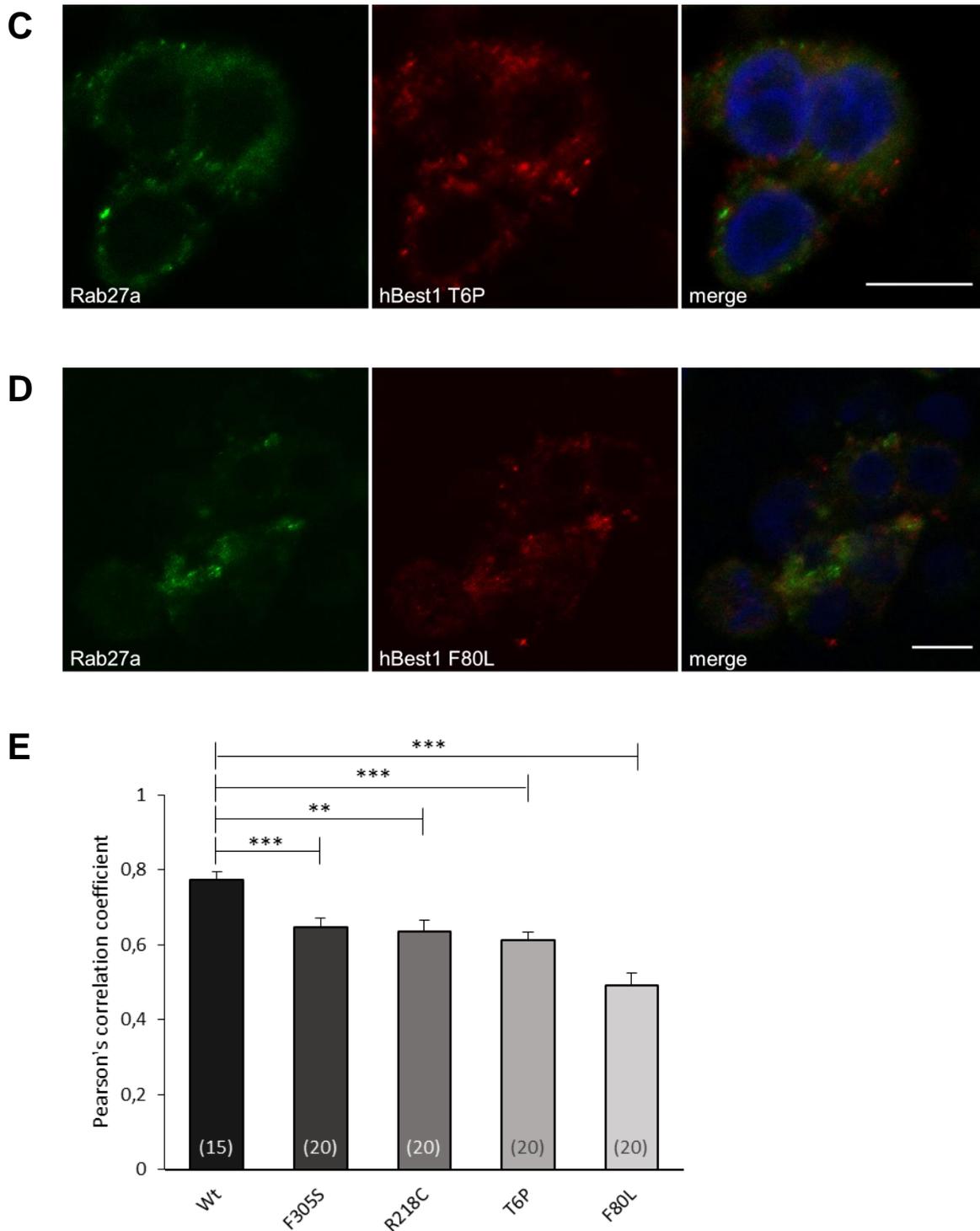


Abb. 3.7: Subzelluläre Lokalisation von Rab27a und krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten. CHO-Zellen wurden mit Rab27a (grün) und verschiedenen Bestrophin-1-Punktmutanten (rot) transfiziert. Gelbe Färbung in Überlagerungsbildern ist ein Hinweis auf eine Kolo-kalisation der beiden Proteine. Zellkerne sind blau gefärbt. Maßstab: 10 μ m. **A:** Transfektion und Färbung der Bestrophin-1-Mutante F305S. **B:** Transfektion von R218C. **C:** Transfektion von T6P. **D:** Transfektion von F80L. **E:** Bestimmung des PCC zwischen Rab27a und dem jeweiligen Bestrophin-1 zur Bewertung der Kolo-kalisation. (Daten gegeben

als Mittelwert \pm SEM; n = 20) Die Bewertung der Signifikanz erfolgte in Bezug auf die Kolokalisation bei Vorliegen des Bestrophin-1-Wt. (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Wt: n = 15)

3.3.1 Simulation autosomal-dominant-negativer Effekte: Tripletransfektionen

Da Morbus Best autosomal-dominant vererbt wird, wurden exemplarisch die Mutanten Bestrophin-1-F305S und T6P gemeinsam mit dem Bestrophin-1-Wt und Rab27a transfiziert. Die Ratio zwischen mutantern und wildtypischem Bestrophin-1-Plasmid betrug stets 1 : 1.

Die Auswirkungen auf die Protein/Protein-Interaktion mit dem Rab27a-Protein wurden wiederum in Koimmunpräzipitationen beurteilt. Hier zeigte sich auch bei heterozygoter Genausprägung des Bestrophin-1, in vitro erzeugt durch die Doppeltransfektion von Bestrophin-1-Wt und einer Bestrophin-1-Mutante in denselben Zellen, trotz anteiligen Vorliegens des Wildtyps eine beeinträchtigte Wechselwirkung (Abb. 3.8). Von drei Experimenten waren jeweils zwei auswertbar, bei den übrigen waren die Banden für eine zuverlässige Quantifizierung zu schwach. Da sich dies nicht nur auf die **IP**-Banden bezog, sondern auch die Banden im Lysat und der nicht gebundenen Fraktion nur sehr schwach detektiert wurden, konnte es nicht eindeutig als Effekt zugeordnet werden. Deshalb wurde von einer Beurteilung hinsichtlich der Bindung abgesehen. Bei den Versuchen, bei denen T6P zusammen mit Bestrophin-1-Wt transfiziert worden war, koimmunpräzipitierte Bestrophin-1 schlecht mit Rab27a. Das Verhältnis zwischen der Intensität der 67-kDa-Bande im Präzipitat zu derjenigen im Lysat lag hier bei $0,2 \pm 0,04$ (n = 2) und ähnelte somit dem Verhältnis bei Doppeltransfektion von T6P und Rab27a ohne Bestrophin-1-Wt. Bei F305S fiel dagegen bei Betrachtung der Resultate sofort eine große Diskrepanz auf. Während die **IP**-Bande sich in einem der Versuche sogar schwächer als in den Durchgängen ohne Nachahmung des autosomal-dominanten Effekts zeigte, entsprach das Ergebnis des anderen Durchlaufs vom Aspekt her dem des Bestrophin-1-Wt. Zur Beurteilung des tatsächlichen Effekts sind weitere Wiederholungen nötig. Der Übersicht halber wird das Experiment dennoch im Diagramm dargestellt.

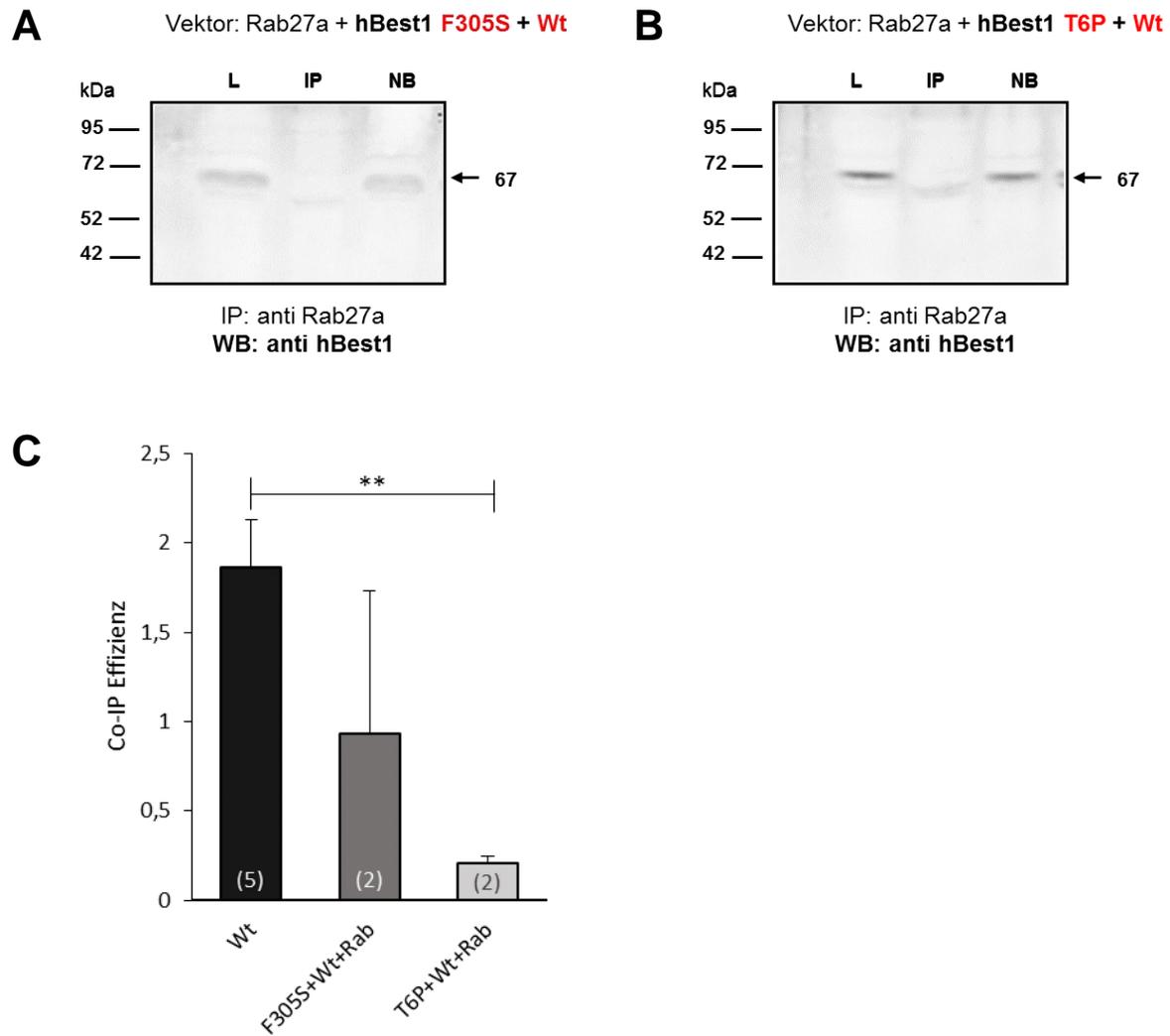


Abb. 3.8: Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1 bei Imitation eines autosomal-dominanten Erbgangs. CHO-Zellen wurden mit Rab27a und einer krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutante sowie dem Bestrophin-1-Wt transfiziert. Rab27a wurde präzipitiert, die Färbung erfolgte gegen Bestrophin-1 (67 kDa). Schwache Banden in der IP sprechen für eine deutlich abgeschwächte Koimmunpräzipitation. (L = Lysat, IP = Immunpräzipitat, NB = nicht gebundene Fraktion) **A:** Koimmunpräzipitation von Bestrophin-1 nach Transfektion von Bestrophin-1-F305S, Bestrophin-1-Wt und Rab27a. **B:** Koimmunpräzipitation nach Transfektion von T6P, Bestrophin-1-Wt und Rab27a. **C:** Zur Quantifizierung der Effizienz wurde das Verhältnis zwischen Intensität der Bande in der IP und Intensität der Bande im Lysat gebildet (IP : L). (Daten gegeben als Mittelwert ± SEM; n = 2) Bewertung der Signifikanz der Abweichung gegenüber der wildtypischen Effizienz. (* p < 0,05, ** p < 0,01; Wt: n = 5)

3.4 Suche nach einer Interaktionsdomäne zwischen Rab27a und Bestrophin-1

Im Folgenden sollte der Bereich eingegrenzt werden, der auf molekularer Ebene die Basis für die Interaktion zwischen Bestrophin-1 und Rab27a bildet. Mit diesem Ziel wurden verschiedene Mutanten hergestellt, denen bestimmte strategisch wichtige Domänen fehlten.

3.4.1 Mutanten

Auf seinem hochkonservierten N-terminalen Ende besitzt humanes Bestrophin-1 mehrere Transmembranhelices. Dazwischen befinden sich sowohl extra- als auch intrazelluläre Abschnitte (Hartzell *et al.*, 2008). In Letzteren könnte sich die gesuchte Interaktionsdomäne befinden. Untersucht wurden eine Mutante, welcher der komplette N-Terminus fehlte, hBest1del 1-292, und eine Doppelmutante ohne die bekannten Prolinreichen Bereiche (PxxP-Motive zwischen Aminosäure 330-346 und 4 PxxP-Motive zwischen 468-486; V. M. Milenkovic *et al.*, 2011a; Reichhart *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008), hBest1del 320-350 + 457-570. Eine dritte Deletionsmutante kombinierte die ersten beiden. Bei ihr waren sowohl der N-Terminus als auch die hinteren PxxP-Motive entfernt worden (hBest1del 1-292 + 457-575). Zusätzlich wurden für die vorliegende Arbeit eine Mutante ohne den vollständig zytoplasmatischen Bereich zwischen den beiden genannten Prolinreichen Domänen kloniert, sowie eine weitere Mutante, der nur die ersten 50 Aminosäuren fehlten, also das N-terminale Ende mit der ersten intrazellulären und der ersten Transmembrandomäne (hBest1del 380-456 und hBest1del 1-50). Das Epitop für den Anti-Bestrophin-1-Antikörper blieb bei allen Mutanten erhalten. In Abb. 3.9 sind die Mutanten graphisch dargestellt.

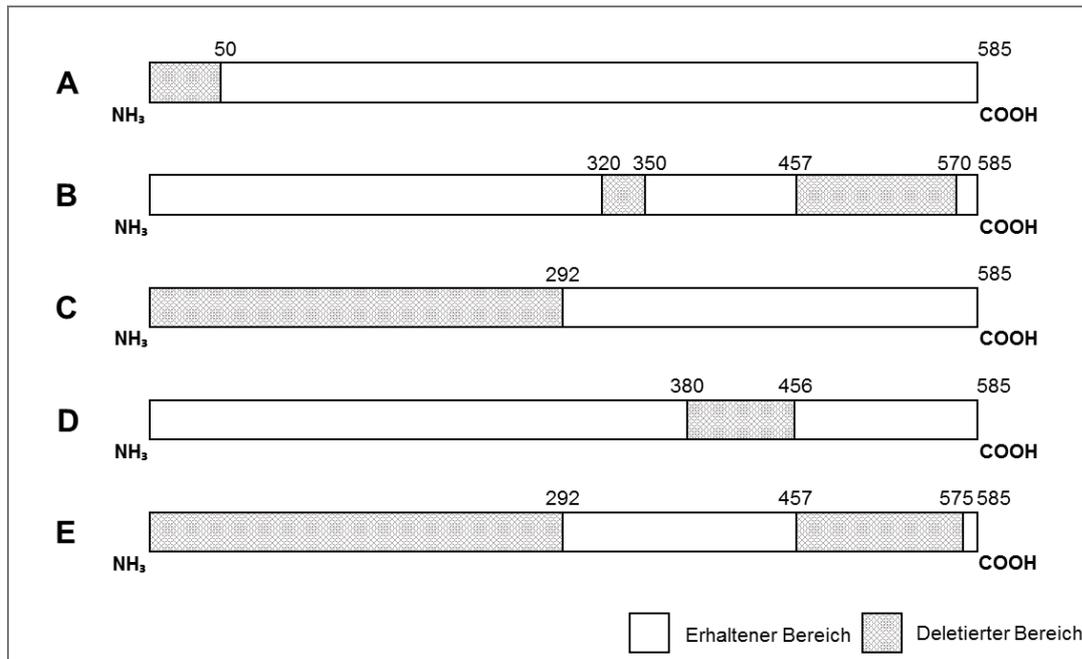


Abb. 3.9: Verwendete Bestrophin-1-Deletionsmutanten. Darstellung im Vergleich zum wildtypischen Protein. **A:** hBest1del 1-50. **B:** hBest1del 320-350 + 457-570. **C:** hBest1del 1-292. **D:** hBest1del 380-456. **E:** hBest1del 1-292 + 457-575.

3.4.2 Ergebnisse der Suche nach einer Interaktionsdomäne

Die Mutante, bei der lediglich der C-Terminus erhalten war, die Doppelmutante ohne die PxxP-Motive und die Mutante, der die Aminosäuren 380-456 fehlten, wurden für Koimmunpräzitationen genutzt. Mithilfe von Cobalt-Beads wurde Rab27a präzipitiert und in den Präzipitaten Bestrophin-1 nachgewiesen, wobei für jede Mutante das zu erwartende Bestrophin-1-Molekulargewicht im Vorfeld berechnet wurde (hBest1del 1-292: 33 kDa; hBest1del 320-350 + 457-570: 51 kDa; hBest1del 380-456: 59 kDa). Bei allen Mutanten war eine Interaktion mit Bestrophin-1 nachweisbar (Abb. 3.10). Im Vergleich zum Lysat enthielt das Präzipitat jeweils noch mehr Bestrophin als bei den Experimenten mit Bestrophin-1-Wt. Die Schwankungen zwischen den Durchläufen waren allerdings vergleichsweise groß, sodass der Unterschied nur bei hBest1del 380-456 rechnerisch signifikant ($p = 0,02$) und insgesamt am ehesten als Folge der Überexpression zu werten war.

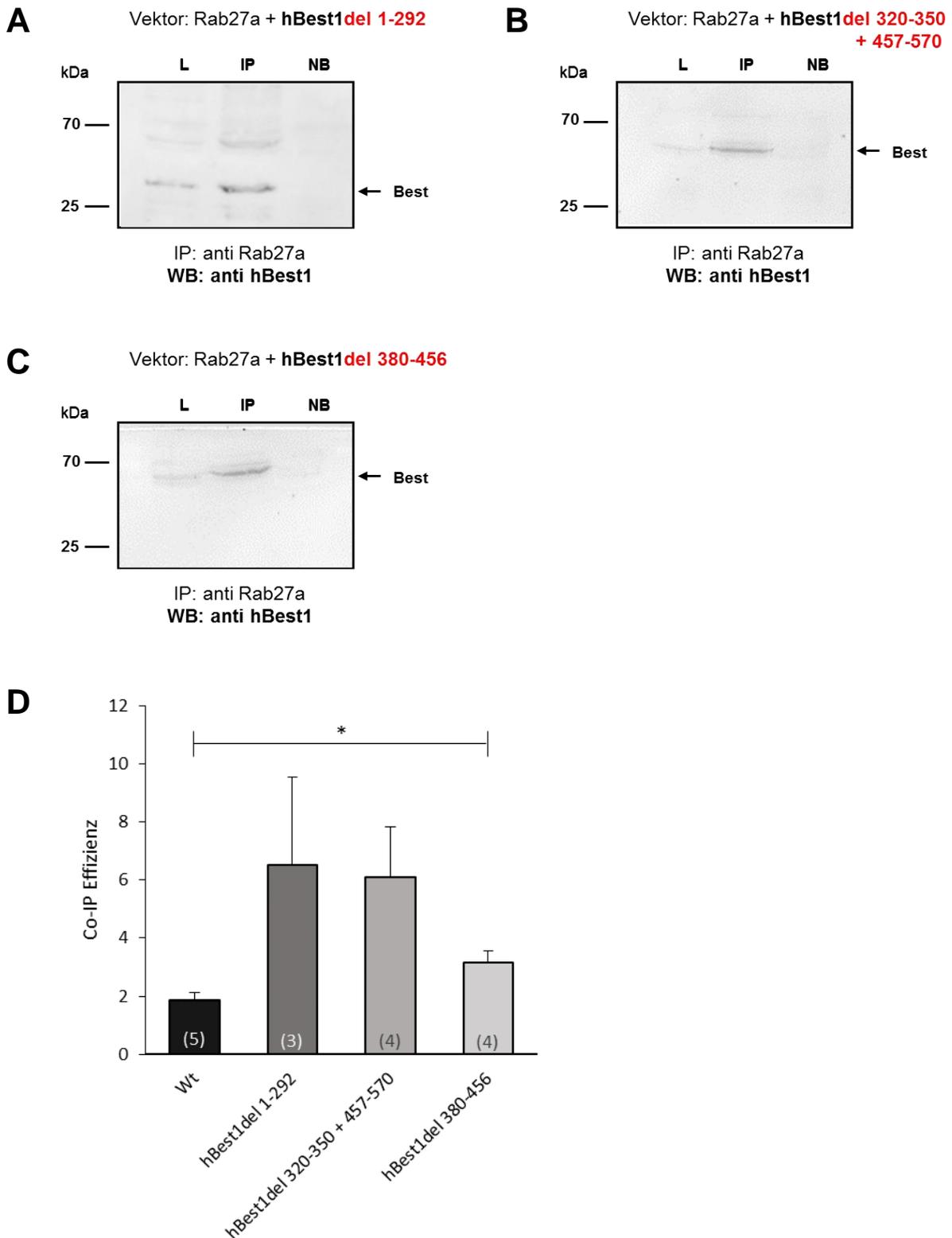


Abb. 3.10: Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1-Deletionsmutanten zur Bestimmung der Interaktionsdomäne. CHO-Zellen wurden mit Rab27a und jeweils einer Bestrophin-1-Mutante transfiziert. Rab27a wurde immunpräzipitiert und im Western Blot Bestrophin-1 (67 kDa) gefärbt. (L = Lysat, IP = Immunpräzipitat, NB = nicht gebundene Fraktion) **A:** Koimmunpräzipitation nach Transfektion von hBest1del 1-292. **B:** Koimmunpräzipitation

nach Transfektion von hBest1del 320-350 + 457-570. **C:** Koimmunpräzipitation nach Transfektion von hBest1del 380-456. **D:** Um die Effizienz der Interaktion zu quantifizieren, wurde das Verhältnis zwischen der Intensität der Bande in der **IP** und Intensität der Bande im Lysat gebildet (**IP : L**). (Daten gegeben als Mittelwert \pm SEM; n = 3-4) Bewertung der Signifikanz der Abweichung gegenüber der wildtypischen Effizienz. (* p < 0,05; Wt: n = 5)

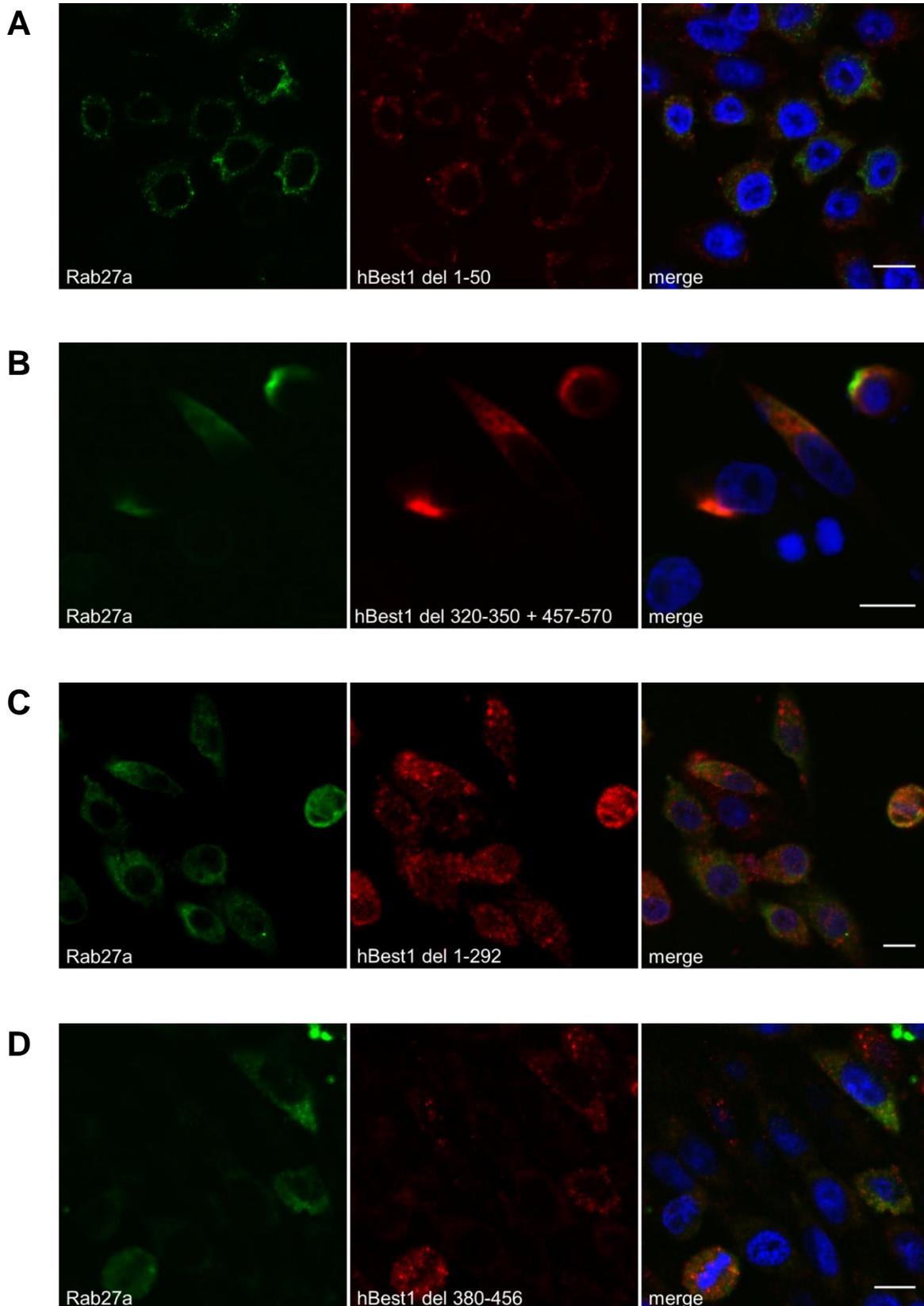
Um die für den zytosolischen Transport wichtigsten Bereiche zu identifizieren, wurden mit Rab27a und jeweils einer der Deletionsmutanten doppeltransfizierte CHO-Zellen immunzytochemisch gefärbt. Die Effizienz des zielgerichteten Transports erwies sich bei den verschiedenen Mutanten als unterschiedlich stark eingeschränkt (Abb. 3.11).

Das mutierte Protein, für welches das Bestrophin-1-Gen kodierte, bei dem lediglich die ersten 50 Aminosäuren entfernt worden waren, war wie der Wildtyp peripher, vermutlich in der Zellmembran, verteilt und dabei nur ein wenig unregelmäßiger als dieser. CHO-Zellen mit hBest1del 320-350 + 457-570, der Doppelmutante ohne die PxxP-Motive, wiesen eine heterogene Bestrophin-1-Verteilung auf. Stellenweise ähnelte die subzelluläre Lokalisation wildtypischem Bestrophin-1, zum Teil fand sich hBest1del 320-350 + 457-570 aber auch eher punktuell gehäuft oder im Zytosol. Das Produkt von hBest1del 380-456 war diffus in der ganzen Zelle zu finden, in der Tendenz allerdings eher peripher. Das Erscheinungsbild war dabei nicht gleichmäßig, sondern es fanden sich punktuelle Häufungen. Die beiden Mutanten, denen der komplette N-Terminus fehlte, hBest1del 1-292 und hBest1del 1-292 + 457-575, waren zytoplasmatisch lokalisiert und ebenfalls stellenweise kumuliert.

Der Transport von Rab27a an den Zielort blieb unbeeinträchtigt.

Die Bestimmung des PCC in fusionierten Bildern ergab eine Verminderung der Kolo-kalisation mit Rab27a gegenüber Bestrophin-1-Wt bei allen untersuchten Deletionsmutanten. Passend zur optischen Einschätzung war die Kolo-kalisation bei hBest1del 1-50 mit einem PCC von $0,66 \pm 0,02$ (n = 15) am größten. Darauf folgten in dieser Reihenfolge die Mutanten hBest1del 320-350 + 457-570, hBest1del 1-292 und hBest1del 380-456. Der PCC für hBest1del 320-350 + 457-570 entsprach $0,6 \pm 0,02$ (n = 15), für hBest1del 1-292 betrug er $0,57 \pm 0,01$ (n = 16) und für hBest1del 380-456 noch $0,52 \pm 0,02$ (n = 15). Mit einem PCC von nur $0,42 \pm 0,03$ (n = 15) korrelierte die Verteilung des Bestrophins in CHO-Zellen, die die Mutation hBest1del 1-292 + 457-575

trugen, mit Abstand am schlechtesten mit der Ausbreitung von Rab27a. Damit lag in allen Fällen eine signifikante Verringerung des PCC im Vergleich zu Zellen vor, die mit dem Bestrophin-1-Wt transfiziert worden waren.



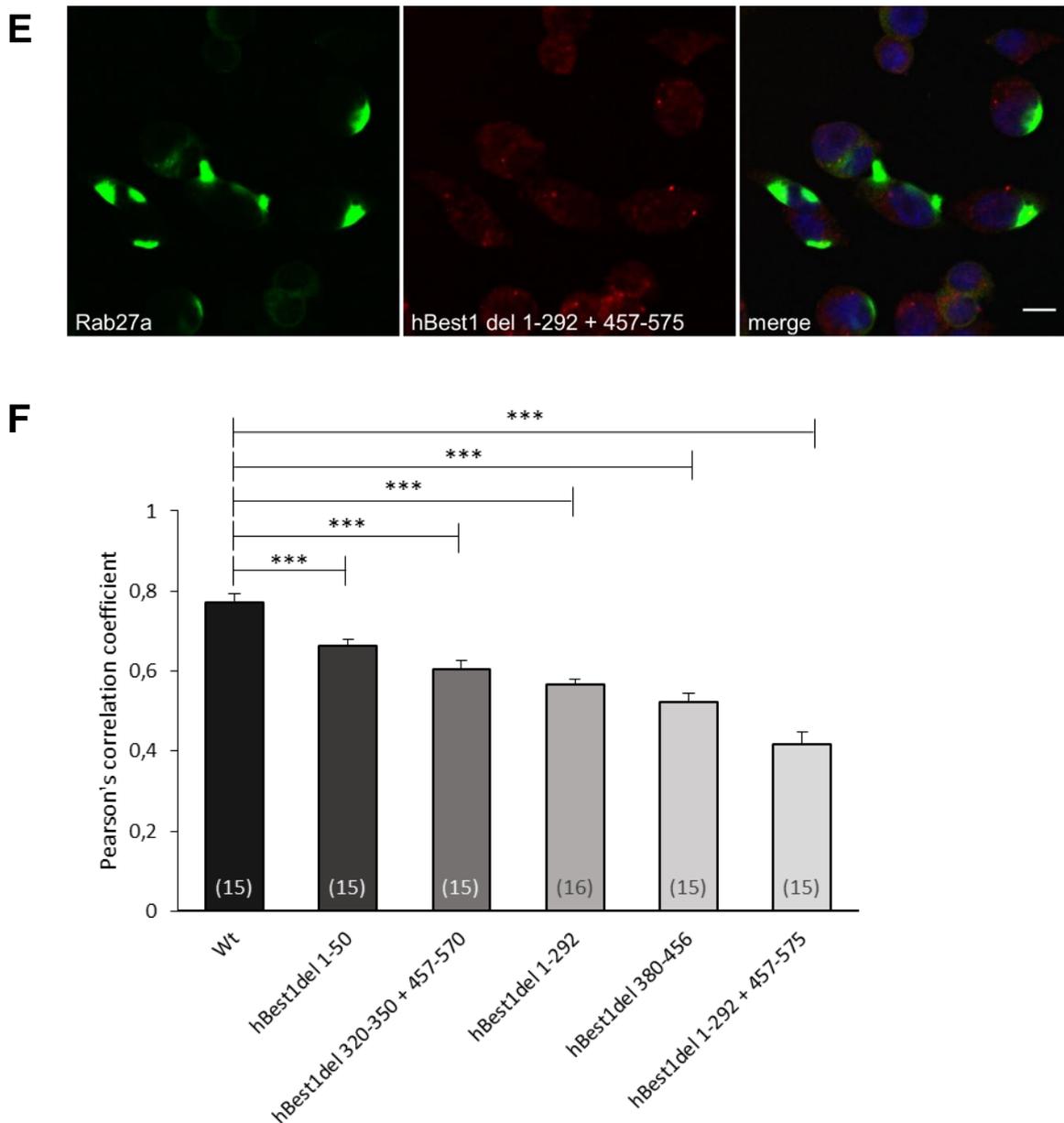


Abb. 3.11: Subzelluläre Lokalisation von Rab27a und Bestrophin-1-Deletionsmutanten. CHO-Zellen wurden mit Rab27a (grün) und verschiedenen Bestrophin-1-Deletionsmutanten (rot) transfiziert. Gelbe Farbe in den Überlagerungsbildern ist ein Hinweis auf eine Kolo-kalisation der beiden Proteine. Zellkerne sind blau gefärbt. Maßstab: 10 μ m. **A:** Transfektion und Färbung der Bestrophin-1-Mutante hBest1del 1-50. **B:** Transfektion von hBest1del 320-350 + 457-570. **C:** Transfektion von hBest1del 1-292. **D:** Transfektion von hBest1del 380-456. **E:** Transfektion von hBest1del 1-292 + 457-575 **F:** PCC zwischen Rab27a und dem jeweiligen Bestrophin-1. (Daten gegeben als Mittelwert \pm SEM; n = 15-16) Es wurde die Signifikanz der Abweichung von Korrelationswerten bei Vorliegen des Bestrophin-1-Wt bestimmt. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte in Koimmunpräzipitationen eine Interaktion zwischen der GTPase Rab27a und Bestrophin-1 gezeigt werden, die bei Vorliegen bestimmter BVMD-assoziiierter Mutationen des Bestrophin-1 nur noch in abgeschwächter Form im Vergleich zum Bestrophin-1-Wt stattfindet. Immunzytochemische Untersuchungen wiesen nach, dass Rab27a und der Bestrophin-1-Wt im Überexpressionssystem *in vitro* in der Zellmembran oder in unmittelbarer Nähe dieser kolokalisieren. Bestrophin-1-Mutationen beeinflussen die subzelluläre Verteilung des Bestrophin-1, nicht jedoch die von Rab27a, sodass die Koexpression entsprechend verringert ist. Diese Ergebnisse implizieren eine mögliche Beteiligung von Rab27a am intrazellulären Bestrophin-1-Transport und in der Pathogenese der BVMD.

4.1 Limitationen der Methoden

4.1.1 Limitationen der Koimmunpräzipitation

Bei Nachweis eines kopräzipitierten Proteins wird die Bindung im Sinne einer schon in der Zelle stattfindenden Interaktion gewertet. Allein mithilfe dieser Methode kann aber nicht mit abschließender Sicherheit gesagt werden, ob es sich tatsächlich so verhält, sodass stets weitere Untersuchungen zur Überprüfung nötig werden. Als ein Indiz – jedoch kein Beweis – für eine tatsächliche Interaktion gilt es, wenn sich der Versuch in beide Richtungen (mit Protein A respektive Protein B als Antigen) wiederholen lässt.

Ein Lysat ist immer ein artifizielles System und es lassen sich nur solche Interaktionen nachweisen, deren Bindungen stabil genug sind, dass sie den mechanischen und chemischen Stress der Lyse sowie der Waschschrte überstehen. Wichtig in diesem Zusammenhang sind die Wahl der richtigen Puffer und der vorsichtige Umgang mit den Proben. Andererseits kommen durch den Kompartimentierungsverlust der Zelle Zellbestandteile miteinander in Kontakt, die *in vivo* vielleicht niemals aufeinandertreffen, und deren mögliche Interaktionen somit in der lebenden Zelle schlicht keine Rolle spielen. Um Fehlannahmen durch dadurch entstehende falsch positive Resultate zu vermeiden, kann beispielsweise im Vorfeld die Expression in intakten Zellen immunzytochemisch untersucht werden. Eine hohe Korrelation der Lokalisation spricht für eine physikalische Interaktion auch in intakten Zellen. Da sich in einem Zelllysate viel mehr als nur die zu untersuchenden Proteine befinden, lassen sich auch unspezifische Bindungen kaum vermeiden. In diesem Fall helfen oft sorgfältig durchgeführte Waschvorgänge sowie die

Wahl einer möglichst geringen Menge an primärem Antikörper. Dennoch können Bindungen zum Beispiel aufgrund hydrophober Wechselwirkungen allein mit dieser Methode oft nicht vollständig ausgeschlossen werden. Überdies besteht die Möglichkeit einer indirekten Koimmunpräzipitation, bei der zwar eine Protein/Protein-Interaktion stattfindet, allerdings nicht direkt, sondern über weitere im Komplex dazwischen hängende, nicht nachgewiesene Proteine. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind kardiale L-Typ-Ca²⁺-Kanäle. Für sie wurde gezeigt, dass sie in einem Makrokomplex vorliegen, der Proteine der kompletten intrazellulären Signalkaskade der adrenergen Stimulation umfasst, darunter ein β -Rezeptor, ein G-Protein, Adenylatzyklase sowie Proteinkinase A (Davare *et al.*, 2001).

Proteine werden über ihre Anfärbbarkeit mit einem Antikörper und den Vergleich mit einem Größenstandard identifiziert, wofür das Molekulargewicht bekannt sein muss. Es ist denkbar, wenn auch unwahrscheinlich, dass sich ein anderes Protein mit ähnlicher Größe mit dem gleichen Antikörper anfärben lässt und es zu Verwechslungen kommt. Je spezifischer der Antikörper, desto geringer ist diese Gefahr.

4.1.2 Limitationen der Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbungen machen Antigene indirekt über eine Immunreaktivität der an sie gebundenen Antikörper sichtbar. Dabei kann das tatsächliche Vorliegen der gesuchten Antigene nicht zweifelsfrei bewiesen werden, weshalb möglichst spezifische Antikörper genutzt werden sollten. Beim Vergleich der Verteilung mehrerer Antigene sollte beachtet werden, dass die Reaktivität verschiedener Antikörper variabel sein kann. Als Resultat kann unter Umständen eine Kolo-kalisation verkannt werden, wenn die Menge eines Antigens am jeweiligen Ort zu gering ist. Der Nachweis einer hohen Kolo-kalisation zweier Proteine in der Immunzytochemie dient als Indiz, dass eine Interaktion in der lebenden Zelle möglich wäre. Dies heißt jedoch nicht zwangsläufig, dass diese *de facto* stattfindet. Hinzu kommt, dass in immunzytochemischen Färbungen die genaue Lokalisation in der Regel nicht zweifelsfrei bestimmt, sondern nur abgeschätzt werden kann. Färbungen von Proteinen, deren subzelluläre Verteilung bekannt ist, können im Vergleich die Einschätzung erleichtern. Bei konfokalen Bildern kann man versuchen, mithilfe von Kantendetektion (*edge detection*) die relative Oberflächenexpression der detektierten Proteine zu bestimmen. Dazu kann zum Beispiel ImageJ genutzt werden. Bei dem entsprechenden Algorithmus werden freihändig

einzelne Zellen und in einem separaten Schritt die intrazellulären Regionen selbiger selektiert. Die Anzahl der Pixel kann nun jeweils separat analysiert und rechnerisch verglichen werden (ganze Zelle - intrazelluläre Bereiche = Pixel in Membran) (zur Vorgehensweise siehe auch V. M. Milenkovic *et al.*, 2011a). Die Methode ermöglicht keine absolute Quantifizierung.

4.1.3 Übertragbarkeit auf humanes RPE

Alle Experimente dieser Studie wurden an CHO-K1-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte epitheliale Zelllinie aus Ovarialzellen eines chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*) (Tjio & Puck, 1958). Es stellt sich die Frage, inwieweit die Daten aus dem heterologen Expressionssystem auf den lebenden Organismus und insbesondere auf Zellen des humanen RPE übertragbar sind.

Sowohl Bestrophin-1 als auch Rab27a finden sich im RPE (Abb. 4.1), die wichtigste Voraussetzung für eine Übertragbarkeit ist somit gegeben (A. D. Marmorstein *et al.*, 2000; Reichhart *et al.*, 2010; Reichhart *et al.*, 2015).

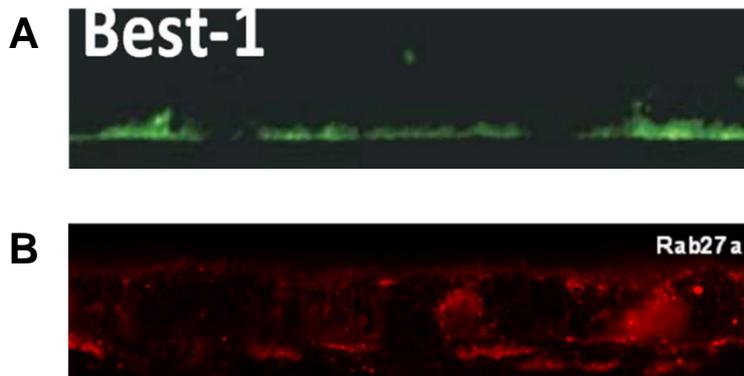


Abb. 4.1: Proteinnachweis im RPE. **A:** Schweine-RPE gegen Bestrophin-1 gefärbt. Bestrophin-1 findet sich an der basolateralen Seite des RPE. Quelle: Reichhart *et al.*, 2010 **B:** Maus-Retina gefärbt gegen Rab27a. Rab27a kommt ebenfalls im RPE vor. Quelle: Reichhart *et al.*, 2015

Ein Unterschied zwischen der Situation im RPE und den Gegebenheiten in vitro ergibt sich aus der Tatsache, dass es sich bei dem experimentell genutzten System um ein Überexpressionssystem handelt. Überexpression kann durch Überladung zellulärer Ressourcen zum Beispiel den intrazellulären Transport mancher Proteine beeinflussen und das Zellwachstum behindern (Kintaka *et al.*, 2016; Moriya, 2015). Jentsch *et al.* zeigten, dass CIC-3, ein normalerweise intrazellulär lokalisierter Cl⁻-Kanal, unter

manchen Überexpressionsbedingungen die Membran erreichen kann (Jentsch *et al.*, 2002). Es gibt die Hypothese, dass auch Bestrophin-1 ein intrazellulärer Cl⁻-Kanal ist (Strauß *et al.*, 2012). Für ein paar der Bestrophin-1-Mutanten wurden in der Vergangenheit Diskrepanzen zwischen den Protein-Lokalisationen in verschiedenen Expressionssystemen festgestellt. Die ARB-Mutante Bestrophin-1-R141H etwa liegt in iPSC-RPE-Zellen, einem nativen RPE-Modell, in Anwesenheit von endogenem Bestrophin-1 korrekt lokalisiert vor, bei Koexpression mit Bestrophin-1-Wt in heterolog transfizierten MDCK-Zellen jedoch überwiegend intrazellulär (Johnson *et al.*, 2017). Sicher ist allerdings, dass zwischen den verschiedenen Mutanten Unterschiede beim Transport bestehen. In einem Versuch, die Quartärstruktur von Bestrophin-1 zu bestimmen, wurde bereits 2002 gefunden, dass das Protein Oligomere formt (Sun *et al.*, 2002). Eine andere Studie führte dieses Ergebnis jedoch auf Überexpression zurück. Die Autoren vermuteten, dass Bestrophin-1 im nativen Zustand Dimere bildet (A. D. Marmorstein *et al.*, 2009; Stanton *et al.*, 2006). Obgleich aus röntgenkristallographischen Analysen mittlerweile bekannt ist, dass es sich bei dem Bestrophin-1-Kanal um einen pentamerischen Ionenkanal handelt (Kane Dickson *et al.*, 2014; T. Yang *et al.*, 2014), kann dies als weiteres Beispiel für den möglichen Einfluss des genutzten experimentellen Systems gewertet werden. Überdies spielen *in vivo* unterschiedliche Aktivierungszustände eine Rolle. Rab27a liegt in der Zelle physiologischerweise in zwei Aktivierungszuständen vor, der prenylierten, aktiven Form, in der die meisten Wechselwirkungen stattfinden, sowie einer unprenylierten, inaktiven Form (Ali & Seabra, 2005; Hutagalung & Novick, 2011). Der Prenylierungszustand wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht kontrolliert, und es ist bislang nicht bekannt, ob er bei der untersuchten Interaktion überhaupt eine Relevanz hat. Im Überexpressionssystem könnte die Prenylierungsaktivität ins Ungleichgewicht geraten, weil möglicherweise nicht genug Prenylierungsenzyme vorhanden sind. Die Beurteilung der Rab27a-Funktion war deshalb nur eingeschränkt möglich. Auch für Bestrophin-1 scheinen verschiedene Aktivierungszustände *in vivo* eine Relevanz zu haben. So wird die Cl⁻-Leitfähigkeit des Bestrophin-1 durch Ca²⁺ aktiviert (Qu *et al.*, 2003; Tsunenari *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2008). Ferner wird eine Regulation durch Phosphorylierung diskutiert (Duran *et al.*, 2013; Hartzell *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009). Eventuell kann auch die Anwesenheit oder das Fehlen anderer, in diesem Zusammenhang bisher nicht erforschter Zellbestandteile einen Einfluss auf die Funktion nehmen. Im vorliegenden Fall wurde wie in den meisten Studien das aus 585 Aminosäuren bestehende Protein der

Transkriptionsvariante 1, welches als Bestrophin-1-Wt bezeichnet wird, verwendet. In GenBank sind für endogen exprimiertes Bestrophin-1 dagegen mehrere alternative Spleißvarianten hinterlegt, deren Signifikanz unklar bleibt. Die Transkription dieser könnte in funktionell unterschiedlichen Proteinen resultieren. Kuo *et al.* fanden beispielsweise, dass die Isoform Best1V2 (GenBank NM_001139443) keine funktionstüchtigen Cl⁻-Kanäle bilden kann. Einschränkend muss aber gesagt werden, dass Best1V2 zwar natürlich im humanen RPE vorkommt, aber nicht eindeutig geklärt ist, ob es sich dabei tatsächlich um eine physiologische Variante oder vielmehr um fehlerhafte Produkte handelt (Kuo *et al.*, 2014; Wistow *et al.*, 2002).

Konkrete Rückschlüsse auf die physiologische Relevanz der Ergebnisse können folglich erst gezogen werden, wenn Daten aus endogener Expression zum Vergleich vorliegen.

4.1.4 Validität der erhobenen Daten

Es wurde versucht, die Gefahr falsch positiver Ergebnisse bei den Immunpräzipitationen zu minimieren, indem die Koimmunpräzipitationen mehrfach wiederholt und in beide Richtungen mit Rab27a respektive Bestrophin-1 als direkt präzipitiertes Protein durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Immunzytochemie unterstützten die in den Western Blots gewonnenen Beobachtungen. Dabei können Kolokalisationsanalysen zwar zeigen, dass eine physikalische Interaktion in den Zellen tatsächlich möglich ist, das Stattfinden dieser indessen nicht beweisen. Eine Kantendetektionsanalyse wurde versucht. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Qualität der konfokalen Bilder hierfür nicht ausreichte, sodass es nicht möglich war, die Zellmembran sicher abzugrenzen. Auf die Darstellung und Interpretation der Ergebnisse wurde deshalb verzichtet.

Dies ist bereits die dritte Arbeit, in der eine Wechselwirkung zwischen Rab27a und dem Bestrophin-1-Wt nachgewiesen werden konnte. Andrea Wagner zeigte diese in ihrer Dissertation an HEK293-Zellen (Wagner, 2014). Sarka Krejcova gelang der Nachweis der gleichen Interaktion in Lysaten frisch isolierter humaner RPE-Zellen aus Bulbi nach Hornhauttransplantation (2007, pers. commun.). Somit lässt sich die Interaktion in verschiedenen Expressionssystemen reproduzieren. Diese Reproduzierbarkeit spricht dafür, dass es sich auch bei der Koimmunpräzipitation, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, nicht um ein unspezifisches Artefakt handelt, und steigert demnach wesentlich die Sicherheit der Interpretation der hier erhobenen Daten. Ein weiterer Hinweis für eine tatsächliche Interaktion ist der gestaffelte Ausprägungsgrad der Bindung,

der sich bei den krankheitsassoziierten Punktmutanten konsequent darstellte (s. Kap. 3.3).

Der Nachweis einer Interaktion in humanen RPE-Zellen deutet darüber hinaus darauf hin, dass sich auch die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Situation im humanen RPE übertragen lassen, entsprechende Versuche sollten jedoch durchgeführt werden.

4.2 Suche nach einer Interaktionsdomäne

Zur Verifizierung einer funktionellen Bedeutung der beobachteten Wechselwirkung sollte sie auf molekularer Ebene näher eingegrenzt werden. Mit diesem Ziel wurden verschiedene Deletionsmutanten untersucht (s. Kap. 3.4.2). Dabei zeigte sich keine Abschwächung der Koimmunpräzipitation, sodass bislang keine Bindungsdomäne identifiziert werden konnte. Im Gegenteil war sogar eine Erhöhung des IP : L-Quotienten im Vergleich zum Bestrophin-1-Wt zu beobachten. Die Immunzytochemie zeigte eine Verringerung der Kolo-kalisation mit Rab27a bei allen Mutanten.

4.2.1 Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen mit Bestrophin-1-Deletionsmutanten

Für eine funktionelle Relevanz muss sich die gesuchte Interaktionsdomäne in einem Proteinabschnitt befinden, der in situ überhaupt mit Rab27a in Berührung kommen kann. Deshalb wurde die Suche auf die intrazellulären Bestrophin-1-Bereiche beschränkt. Mit Ausnahme von hBest1F305S liegen alle untersuchten krankheitsassoziierten Mutationen N-terminal. Dies trifft auch auf die Mehrheit der BVMD-verursachenden Bestrophin-1-Mutationen generell zu (Boon *et al.*, 2009; Stöhr *et al.*, 2002). Um möglichst viele davon abzudecken, wurde eine Mutante untersucht, der der komplette N-Terminus fehlt. Bei sämtlichen betrachteten Punktmutanten wurde eine Abschwächung der Koimmunpräzipitation mit Rab27a gefunden (s. Kap. 3.3). Dementsprechend würde man eine negative Auswirkung der Deletion des kompletten N-Terminus auf die Interaktionsfähigkeit des Proteins mit Rab27a erwarten. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Stattdessen fand sich bei der entsprechenden Mutante hBest1del 1-292 eine sehr starke Bindung. Das bedeutet, dass die Bestrophin-1/Rab27a-Bindung an Aminosäuresequenzen der C-terminalen Hälfte des Bestrophin-1 geknüpft wird.

Schon für die Interaktion mit Untereinheiten potentialabhängiger Ca²⁺-Kanäle wurden Aminosäuresequenzen auf dem C-Terminus des Bestrophin-1 als verantwortlich

identifiziert. Vor einiger Zeit konnte so gezeigt werden, dass Bestrophin-1 den spannungsabhängigen L-Typ-Ca²⁺-Kanal Ca_v1.3 über eine Bindung an Prolin-reiche Motive moduliert, die von SH3-Domänen der β 4-Untereinheit des Ca²⁺-Kanals erkannt werden. Es sind zwei Cluster mit insgesamt 6 PxxP-Motiven für Bestrophin-1 bekannt (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011a; Reichhart *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008). Da diese Strukturen auch potentielle Bindungsstellen für andere Proteine darstellen, wurde eine Mutante untersucht, bei der alle bekannten PxxP-Motive entfernt worden waren (hBest1del 320-350 + 457-570). Allerdings gibt es für Rab27a keine bekannten SH3-Domänen. Wie erwartet erfolgte auch hier die Koimmunpräzipitation unvermindert stark. Dieses Ergebnis passt zu Daten von Andrea Wagner, die in ihrer Arbeit 2014 außer der Interaktion mit dem wildtypischen Bestrophin-1 auch die Interaktion zwischen Rab27a und einer Bestrophin-1-Deletionsmutante, Bestrophin-CTPxxP, untersuchte. Bei dieser Mutante war ein Bereich von 113 Aminosäuren zwischen Aminosäure 462-575 deletiert worden. Es fehlten ihr somit die C-terminalen PxxP-Motive. Andrea Wagner stellte in ihren Experimenten fest, dass die beiden Proteine weiterhin gegenseitig kopräzipitierten. Dabei war kein offensichtlicher Unterschied zum Bestrophin-1-Wt zu eruieren, wobei eine Quantifizierung nicht stattfand (Wagner, 2014). Der dritten Mutante, die in dieser Arbeit in Koimmunpräzipitationsexperimenten zum Einsatz kam, hBest1del 380-456, fehlte ein großer Teil der Aminosäuresequenz zwischen den erhaltenen PxxP-Motiven. Durch diese Aufteilung sollte eine potentiell C-terminal liegende Bindungsdomäne unmittelbar näher eingegrenzt werden. Wie auch die beiden bereits diskutierten Mutanten zeigte hBest1del 380-456 einen höheren IP : L-Quotienten für die Koimmunpräzipitation mit Rab27a als Bestrophin-1-Wt. In diesem Zusammenhang müssen Sättigungseffekte aufgrund der Überexpression diskutiert werden. Die verfügbaren Programme ermöglichen ab einer gewissen Intensität der Banden keine Quantifizierung mehr. Möglicherweise fanden sich in dem pipettierten Volumen auch etwas mehr Cobalt-Beads als bei den vorherigen Experimenten. Da es sich um eine Suspension handelt, lässt sich die Verwendung einer äquivalenten Menge nicht exakt sicherstellen. Die Unterschiede könnten auch im Rahmen natürlicher Schwankungen zustande gekommen sein. Die Varianz der Ergebnisse war offenbar relativ groß, was sich in hohen Standardfehlern niederschlägt. Lediglich bei einer Mutante, hBest1del 380-456, ergab sich im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Steigerung der Kopräzipitationseffizienz. Bei jeweils nur drei Versuchen sind die angewendeten statistischen Verfahren insbesondere bei großen Diskrepanzen allerdings nur bedingt aussagekräftig. Um etwaige tatsächliche

Unterschiede zwischen dem Bindungsverhalten der Bestrophin-1-Deletionsmutanten und dem Wildtyp gegenüber Rab27a aufzudecken, müssten die Versuche noch mehrere Male wiederholt und umgekehrt auch die Kopräzipitation von Rab27a mit dem Bestrophin beurteilt werden. Angesichts der großen Abweichungen und mangelnden Signifikanz wurde insgesamt eher davon ausgegangen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um eine tatsächliche Intensivierung der ohnehin schon starken Bindung handelt. Es lässt sich allerdings nicht gänzlich ausschließen, dass die beobachtete Bindung auf unspezifischen Wechselwirkungen beruht, welche durch eine veränderte Struktur der mutierten Proteine zustande kommen könnten.

Die Beurteilbarkeit der Western Blots war zudem dadurch herabgesetzt, dass sich die Banden nach Transfektion der Bestrophin-1-Deletionsmutanten auf den PVDF-Membranen nur schwach darstellten. Dies betraf nicht nur die IP-Banden, sondern auch diejenigen des Lysats. In Teilen könnte das durch technische Probleme und einen Wechsel des Antikörpers mitbedingt sein. Proben aus Koimmunpräzipitationen von Bestrophin-1-Wt und Rab27a, die daneben auf denselben Gelen aufgetragen worden waren, wiesen jedoch bei vorab äquivalenten Proteinmengen in NanoDrop-Kontrollen der Lysate deutlich intensivere Banden auf (Abb. 4.2). Daraus wurde geschlossen, dass die mutanten Bestrophine tatsächlich in geringeren Mengen exprimiert oder die defekten Proteine rascher abgebaut wurden. Schnellere Proteolyse ist ein üblicher Mechanismus bei Mutationen, der auch im Zusammenhang mit vielen genetischen Erkrankungen beschrieben ist (Bross *et al.*, 1999). Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste allerdings eine gründlichere quantitative Analyse erfolgen.



Abb. 4.2: Unterschiedliche Bandenintensität je nach verwendetem Bestrophin-1-Plasmid. CHO-Zellen wurden mit Rab27a und Bestrophin-1 transfiziert. Es wurde Rab27a präzipitiert und im Western Blot gegen Bestrophin-1 (67 kDa) gefärbt. (L = Lysat, IP = Immunpräzipitat, NB = nicht gebundene Fraktion) **Links:** Koimmunpräzipitation nach

Transfektion von hBest1del 1-292. **Rechts:** Koimmunpräzipitation nach Transfektion von Bestrophin-1-Wt.

Die Suche nach der Interaktionsdomäne wurde durch methodische Schwierigkeiten verzögert. Anfänglich zeigten die Western Blots sehr viele unspezifische Banden. Dabei war es unmöglich, festzustellen, ob sich auch die gesuchte Proteinbande darunter befand. Es gelang nicht sofort, den sekundären Antikörper als Fehlerquelle zu identifizieren. Die Klonierung der Mutante hBest1del 380-456 glückte erst beim wiederholten Versuch und nahm insgesamt viel Zeit und Ressourcen in Anspruch. Klonierungen bestehen aus vielen Teilschritten und sind dementsprechend anspruchsvoll, da bei jedem Schritt Fehler unterlaufen können. Bei der Ligation mehrerer DNA-Fragmente und der Ligation in den Vektor beruht es zu einem großen Teil auf Zufall, ob sich die Einzelstücke in der richtigen Reihenfolge beziehungsweise Richtung zusammensetzen. Da in dem Labor zusätzlich zu den genannten keine weiteren Bestrophin-1-Deletionsmutanten mit einer Deletion in einem noch nicht näher in Koimmunpräzipitationen betrachteten Bereich zur Verfügung standen, wurde die Suche nach einer Bindungsdomäne an dieser Stelle abgebrochen.

4.2.2 Ergebnisse der Immunzytochemie zur Untersuchung der Deletionsmutanten

Immunzytochemisch wurden zusätzlich zwei weitere Mutanten untersucht. Alle bei ihnen deletierten Aminosäuresequenzen waren bei der Suche nach einer Bindungsdomäne in den Immunpräzipitationsexperimenten durch eine der drei soeben betrachteten Mutanten mitabgedeckt, der sie auch fehlten. Die Kollokalisierung mit Rab27a war bei allen mutierten Bestrophin-1-Formen mehr oder weniger stark eingeschränkt. Bei der Mutante mit der geringsten Übereinstimmung überschritten sich aber noch 42 % der Fluoreszenzsignale der zwei Proteine. Diese 42 % können in der intakten CHO-Zelle auch weiterhin interagieren. hBest1del 1-50 ist die Mutante, die die größten Gemeinsamkeiten mit dem Wildtyp aufweist. Wie der Wildtyp kommt das Genprodukt von hBest1del 1-50 hauptsächlich peripher vor. Der unmittelbar N-terminale Bereich und die erste TMD scheinen für den intrazellulären Transport des Proteins demnach keine überragende Rolle zu spielen. Dennoch ist der PCC kleiner als der des Bestrophin-1-Wt, der Transport muss demzufolge in irgendeiner Form auch bei dieser Mutante behindert sein. Wenig

überraschend ist, dass die Mutanten hBest1del 1-292 und hBest1del 1-292 + 457-575 beide vollständig zytoplasmatisch zu finden waren. Da beiden Mutanten die komplette N-terminale Hälfte fehlt und alle vorhergesagten TMD auf dieser Seite liegen, entsprach dieses Ergebnis den Erwartungen. Interessanterweise kolokalisierte die Mutante, der zusätzlich die Aminosäuren 457-575 fehlten, deutlich schlechter mit Rab27a (nur 42 % Übereinstimmung im Vergleich zu 57 % bei alleinigem Fehlen des N-Terminus). Der Bereich zwischen Aminosäure 457 und 575 scheint folglich für den subzellulären Transport relevant zu sein. Dies bestätigt auch ein Ergebnis von Andrea Wagner, die eine punktuelle Akkumulation der Bestrophin-CTPxxP-Mutante (hBest1del 462-575; s. Kap. 4.2.1) beobachtete (Wagner, 2014). Möglicherweise spielen hierbei die PxxP-Motive, die sich gehäuft in diesem Bereich finden, eine Rolle. Wenn man das Resultat für hBest1del 1-292 + 457-575 einbezieht, kann bei der Mutante hBest1del 320-350 + 457-575 gemutmaßt werden, dass der Effekt durch den Verlust derselben Sequenz zustande kommt. Ein zusätzlicher Einfluss der Deletion des Bereichs zwischen Position 320-350 kann aber nicht ausgeschlossen werden. Interessant ist auch die diffuse, punktuell gehäufte Verteilung von hBest1del 380-456 in der Zelle, die in einem stark erniedrigten PCC bezüglich Rab27a resultiert. Da in diesem Fall keine TMD entfernt wurden, kann man hieraus schließen, dass der fehlende Bereich eine Relevanz für die Transportfähigkeit des Bestrophins zum Zielort hat, zum Beispiel, indem er Bindungsdomänen für Transportproteine beinhaltet. Die Mutationen könnten allerdings auch unspezifischer zu Traffickingproblemen in der Zelle führen, indem etwa eine Anhäufung mutierter Proteine oder eine Behinderung der Interaktion mit anderen Zellbestandteilen indirekt den Transport weiterer Proteine behindert.

Es lässt sich schlussfolgern, dass alle untersuchten mutierten Bestrophine weniger membrangängig sind als Bestrophin-1-Wt, insbesondere erreichen die Mutanten ohne N-Terminus nicht mehr die Zellmembran. Obwohl Unterschiede zwischen den verschiedenen defekten Bestrophinen zu beobachten waren, lies sich keine einzelne Domäne bestimmen, die für den Transport verantwortlich ist. Zu beachten ist bei all diesen Überlegungen allerdings, dass zum Teil sehr große Teile des Proteins entfernt worden waren. Mit Ausnahme von hBest1del 380-456 korrelierte die Verminderung des PCC und die Beeinträchtigung der regulären Verteilung dabei mit der Länge des deletierten Bereichs. Bei der Mutante mit der größten Abweichung fehlen mit 410 Aminosäuren über zwei Drittel des ursprünglichen Proteins. Es ist nicht zu erwarten, dass

sich das Genprodukt bei einer solch radikalen Deletion noch genauso verhält wie das Volllängenprotein. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die Tertiärstruktur des mutanten Bestrophin-1 eine andere als beim Wildtyp, was dazu führen könnte, dass das fehlerhafte Produkt in einer anderen Geschwindigkeit abgebaut wird oder Bindungsstellen für Transportproteine zwar noch erhalten, aber nicht mehr zugänglich sind. Einzig hervorzuheben ist dabei die Mutante hBest1del 380-456, bei der die Entfernung einer relativ kurzen Sequenz von nur 76 Aminosäuren einen sehr großen Effekt auf die Lokalisation zeigte.

4.2.3 Bindungsbereich und Art der Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1

Wenn man von der Korrektheit der Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen ausgeht, liegt der Schluss nahe, dass eine etwaige Interaktionsdomäne in einem der bei der bisherigen Suche ausgesparten Bereiche liegen müsste. Es bleiben zwei vergleichsweise kurze Sequenzen von jeweils etwa 30 Aminosäuren Länge zwischen Position 292-320 und zwischen Position 350-380. Beide liegen den topologischen Modellen zufolge vollständig zytoplasmatisch (V. M. Milenkovic *et al.*, 2007; Tsunenari *et al.*, 2003) und kämen deshalb prinzipiell als Rab27a-Bindungsstellen infrage. Tsunenari *et al.* identifizierten 2006 eine Asparagin-reiche Domäne unmittelbar nach der letzten TMD als mögliche Ca^{2+} -Bindungsstelle für Bestrophine (Tsunenari *et al.*, 2006). Diese konnte später näher als EF-Hand mit einem mutmaßlichen Ca^{2+} -bindenden Loop zwischen Aminosäure 312-323 definiert werden (Xiao *et al.*, 2008). Die Helix-Loop-Helix-Motive der EF-Hände mit geladenen Aminosäuren sind die am weitesten verbreitete Art von Ca^{2+} -Bindungsdomänen überhaupt (Nelson & Chazin, 1998). Ein Cluster von fünf sauren Aminosäuren (EDDDD) umgeben von einigen weiteren sauren Resten zwischen Aminosäureposition 293-308 ist außerdem essentiell für die Ca^{2+} -Erkennung (Kranjc *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2008). Die Ca^{2+} -Clasps, die Kane Dickson *et al.* in ihrem Paper zur Röntgenstrukturanalyse von Hühner-Bestrophin-1 beschreiben, setzen sich aus dieser Region sowie einem Helix-Turn-Helix-Motiv in unmittelbarer Nähe des N-Terminus zusammen (Kane Dickson *et al.*, 2014). Darüber hinaus existiert eine weitere regulatorische Domäne zwischen Position 350-390. Letztere ist ebenfalls negativ geladen und wichtig für die Ca^{2+} -Aktivierung, aber auch die Inaktivierung offener Kanäle (current rundown) (Kranjc *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2008). Die Abschnitte, die als

potentielle Rab27a-Interaktionsdomänen identifiziert werden konnten, sind demzufolge beinahe deckungsgleich mit den beschriebenen Ca^{2+} -Sensoren.

Bekannte Rab27a-bindende Domänen beinhalten hauptsächlich die für die Rab27a-Interaktion zuständigen Bereiche in den Rab27a-Effektormolekülen (Vgl. Kap. 1.4). Reichhart *et al.* identifizierten unlängst eine Bindungsdomäne für Rab27a in $\text{Ca}_v1.3$, die homolog zur Rab-Bindungsdomäne von Exophilin8 ist, einer konservierten Coiled-Coil-Sequenz (Reichhart *et al.*, 2015). Möglicherweise bindet Rab27a auch über eine als Bindungsstelle noch unbekannt Sequenz an Bestrophin-1, oder die relevanten Aminosäuren sind über die Aminosäuresequenz des Bestrophins verteilt und setzen sich erst durch die dreidimensionale Faltung des Proteins zu einer Bindungsdomäne zusammen. In diesem Fall könnten Veränderungen an verschiedenen Stellen zu Störungen der Interaktion führen. Da bislang keine Interaktionsdomäne identifiziert werden konnte, kann keine Aussage über den genauen Interaktionsmechanismus getroffen werden. Denkbar wäre auch eine indirekte Bindung über ein oder mehrere zwischengeschaltete Proteine. Ein solches Protein müsste endogen sowohl in CHO- als auch in HEK293- sowie humanen RPE-Zellen exprimiert werden. Bedacht werden muss, dass die endogenen Proteine in Überexpressionsexperimenten in der Regel in geringerer Menge exprimiert werden als die heterolog transfizierten. Eine indirekte Interaktion ist deshalb jedoch nicht auszuschließen. Es könnte sich bei dem Mediator beispielsweise um ein normalerweise in hoher Konzentration vorliegendes Protein handeln oder seine Expression durch die heterologen Proteine stimuliert werden. Die als Interaktionsdomäne diskutierten Bereiche deuten auf einen potentiellen Zusammenhang der Bestrophin-1/Rab27a-Wechselwirkung mit der Ca^{2+} -Bindung hin. Mehrere Effektoren von Rab27a besitzen Ca^{2+} -bindende Motive in der Form von C2-Domänen (Abb. 1.6). Ein Beispiel ist das Effektorprotein Rabphilin-3a, welches von Rab27a rekrutiert wird (Fukuda, 2005) und in Anwesenheit von Ca^{2+} an Phospholipidmembranen bindet (Izumi, 2007; Nalefski & Falke, 1996). Im Gegensatz dazu wirkt sich Ca^{2+} bei Exophilin4 inhibitorisch auf die Bindung an Phosphatidylserin aus (Izumi, 2007). Es ist denkbar, dass bei weiteren Proteinen ähnliche Mechanismen anzutreffen sind. Die Inkubationsschritte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit fanden unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen statt. Ca^{2+} könnte also in der Bestrophin-1/Rab27a-Interaktion als Mediator oder als Regulator einer direkten oder indirekten Interaktion fungieren.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen und Immunzytochemie stößt man auf einen scheinbaren Widerspruch: In den Koimmunpräzipitationen zeigt sich eine unbeeinträchtigte Wechselwirkung. Den histologischen Färbungen zufolge würde man jedoch in Relation zum Bestrophin-1-Wt eine Abschwächung erwarten, da sich ein geringerer Anteil der Proteine überhaupt in physikalischer Nähe zueinander befindet. Die unverminderte Effizienz der Bindung weist auf den Kompartimentierungsverlust durch die Lyse hin. Dass in der nicht gebundenen Fraktion keine Banden sichtbar sind, kann zusätzlich durch die generell schwache Ausprägung dieser bedingt sein. Bei Ca^{2+} -Abhängigkeit könnte zudem eine Rolle spielen, dass in den Inkubationslösungen die feine Regulierung des Ca^{2+} fehlt, die in den Zellen stattfindet.

Bedenkt man die regulatorische Funktion, die Rab-Proteine in Transportprozessen einnehmen, so liegt der Schluss nahe, dass Rab27a selbst mit der veränderten subzellulären Verteilung und eingeschränkten Membrangängigkeit der Bestrophin-1-Deletionsmutanten in Verbindung stehen könnte. Der Nachweis einer starken Interaktion in den Koimmunpräzipitationen spricht eher gegen diese Hypothese. Sie darf jedoch nicht voreilig ausgeschlossen werden. So spiegelt das Experiment wie im vorherigen Absatz beschrieben nicht unbedingt die Situation *in vivo* wider. Denkt man in dieser Richtung weiter, gibt es zwei verschiedene Erklärungsansätze für eine gestörte subzelluläre Bestrophin-1-Verteilung trotz guter Kopräzipitation mit Rab27a. Zum einen ist es recht wahrscheinlich, dass Rab27a nicht der einzige Faktor ist, der den Transport von Bestrophin-1 an seinen Zielort steuert. Die Verteilung könnte folglich primär über andere Wege gestört sein. Hier wäre es insbesondere interessant, die Interaktion des Bestrophin-1 auch mit anderen Rab-Proteinen zu untersuchen. Eine durch geringere Kolo-kalisation verminderte Bindung an Rab27a könnte in diesem Fall den subzellulären Transport zusätzlich stören. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Tertiärstruktur des mutierten Bestrophin-1 bei der Lyse verändert wird und es in der Zelle in einer Konformation vorliegt, bei der die notwendigen Bindungsstellen zum Teil verdeckt sind. Eine dritte Erklärung ergibt sich, falls die Bindung tatsächlich Ca^{2+} -abhängig ist. Dann könnte Ca^{2+} der begrenzende Faktor in der Zelle sein, über den die Bestrophin-1/Rab27a-Interaktion reguliert wird. In den beiden letztgenannten Fällen könnte eine Interaktion mit Rab27a im natürlichen Umfeld nicht in dem Ausmaß stattfinden, wie die Koimmunpräzipitationen vermuten lassen.

4.3 Untersuchung krankheitsrelevanter Mutanten

Untersucht wurden vier BVMD-assoziierte Missense-Mutanten. Jede davon kann grob einer der vier verschiedenen Hotspot-Regionen für Bestrophin-1-Mutationen zugeordnet werden (Abb. 4.3), die ursprünglich von White *et al.* beschrieben wurden (White *et al.*, 2000). Für alle Mutanten wurde immunzytologisch eine veränderte subzelluläre Verteilung sowie eine verminderte Korrelation dieser mit der Ausbreitung von Rab27a im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Alle Mutanten mit Ausnahme von R218C zeigten zudem eine eingeschränkte Kopräzipitation mit dem Rab-Protein.

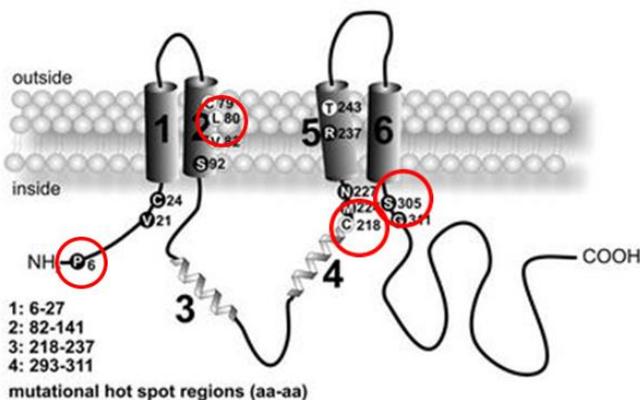


Abb. 4.3: Mutations-Hotspots für Bestrophin-1. Hotspot 1-4. Nach dem Topologiemodell von V. M. Milenkovic *et al.*, 2007. Rot umkreist sind die Mutationen, die in der vorliegenden Studie betrachtet wurden. Quelle: V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b

Sämtliche genutzten Mutanten waren bereits früher von Milenkovic *et al.*, der unserer Arbeitsgruppe großzügigerweise die Plasmide zur Verfügung stellte, in Immunfärbungen und Leitfähigkeitsmessungen erforscht worden (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b). Bestrophin-1-R218C und T6P kamen auch schon zuvor in elektrophysiologischen Untersuchungen und Lokalisationsanalysen zum Einsatz, wobei insbesondere R218C weiterhin häufig untersucht wird (Barro-Soria *et al.*, 2010; Burgess *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2013; A. D. Marmorstein *et al.*, 2004; Rosenthal *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2002).

Die Mutanten Bestrophin-1-T6P und F305S zeigten in der Koimmunpräzipitation mit Rab27a die größten Einschränkungen. Die bei ihnen betroffenen Aminosäuren 6 respektive 305 sind bei normaler Lokalisation zytoplasmatisch gelegen (Abb. 1.4A). Die umgebenden Regionen scheinen also entscheidend für den fehlerfreien Ablauf der Bestrophin-1-betreffenden posttranskriptionellen zellulären Prozesse zu sein. F305S liegt

im langen C-terminalen „Schwanz“ hinter der letzten TMD und ist Bestandteil eines der beiden Areale, die zuvor als potentielle Interaktionsdomänen identifiziert werden konnten (s. Kap. 4.2.3). Gegebenenfalls inhibiert die Mutante die Bindung an Rab27a folglich direkt über eine Veränderung der Aminosäuresequenz dieses Bindungsbereichs. Für Bestrophin-1-T6P kommt ein derartiger Mechanismus eher nicht infrage, da der N-Terminus nach momentanem Kenntnisstand nicht unmittelbar in die Interaktion involviert ist. Eine Erklärung für die Ergebnisse unter Beachtung der sehr intensiven Bindung von hBest1del 1-292 an Rab27a wäre hier eine durch die Missense-Mutation verursachte veränderte Konformation des Proteins.

Bei Bestrophin-1-F80L ist eine Aminosäure in der zweiten TMD ausgetauscht (Abb. 1.4A). Dies bewirkt ebenfalls eine verminderte Bindungsfähigkeit des Proteins an die GTPase Rab27a, die jedoch weniger stark ausgeprägt ist. Grund dafür könnte wiederum eine Veränderung der Tertiärstruktur sein. Im Falle einer indirekten Interaktion ist auch die Existenz mehrerer Bindungsdomänen denkbar, an denen die verschiedenen Stellen der Mutationen beteiligt sein könnten. Die Ergebnisse der Suche nach einer Interaktionsdomäne zeigen aber, dass die einzelnen Mutations-Hotspots alleine nicht sehr ausschlaggebend sein können.

Die letzte BVMD-assoziierte Bestrophin-1-Mutante, die in dieser Studie betrachtet wurde, ist Bestrophin-1-R218C, welche bezüglich der untersuchten Interaktion keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp aufweist. Auch bei dieser Mutante liegt der Basenaustausch im Zytoplasma (Abb. 1.4A). Trotz ähnlichem Muster entspricht die Verteilung von Bestrophin-1-R218C nicht ganz derjenigen des Wildtyps, was sich in einem etwas verminderten PCC für die Korrelation mit Rab27a bemerkbar macht. In der statistischen Auswertung der Koimmunpräzipitationen ergab sich eine geringfügige Verringerung des **IP : L**-Quotienten, die sich jedoch bei der bisherigen Anzahl an Experimenten als nicht signifikant erwies. Es wäre interessant zu sehen, ob sich diese Tendenz bei häufigerer Wiederholung bestätigt. Mögliche Erklärungen für die etwas veränderte subzelluläre Lokalisation sind dementsprechend eine tatsächliche geringe Beeinträchtigung der Interaktion zwischen den beiden Proteinen oder eine Störung anderer transportrelevanter Vorgänge. Umgekehrt könnte auch die verminderte Kolokalisation für die leichte Einschränkung der physikalischen Interaktion zwischen Bestrophin-1 und Rab27a verantwortlich sein. Die Ergebnisse der übrigen Mutanten, insbesondere die gute Kopräzipitation trotz geringerer Kolokalisation bei der

BVMD-verursachenden Mutante Bestrophin-1-F80L sowie den Deletionsmutanten, sprechen jedoch gegen einen derartigen kausalen Zusammenhang.

Vergleicht man die Ergebnisse der Punktmutanten untereinander, lässt sich eine konstante „Rangfolge“ der Bindungseffizienz aufstellen. Diese passt fast exakt zu einer Studie von Milenkovic *et al.* aus dem Jahr 2011, in der 13 BVMD-assoziierte Bestrophin-1-Punktmutanten untersucht wurden, darunter die in der vorliegenden Studie betrachteten. Anhand von Lokalisationsanalysen in transfizierten polarisierten MDCKII-Zellen sowie Leitfähigkeitsuntersuchungen in HEK293-Zellen wurde eine reduzierte Membrangängigkeit der mutierten Proteine sowie ein Verlust der Anionenleitfähigkeit festgestellt. R218C und F80L kolokalisierten dabei mit dem Membranmarker Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT-1), wobei die Effizienz im Vergleich zum Bestrophin-1-Wt etwas verringert war. T6P und F305S zeigten dagegen nahezu keine Überlappung mit MCT-1 und werden folglich fast gänzlich im Zytoplasma retiniert. Für F305S konnte eine Kolokalisation mit dem Early Endosome-1-Marker (EEA1) nachgewiesen werden (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b). Die Mutanten, die laut der in dieser Studie durchgeführten Experimente stärker mit Rab27a interagieren, landen demzufolge eher in der Membran. Dies passt zu der Annahme, dass Rab27a an der Vermittlung des subzellulären Transports des Bestrophins beteiligt sein könnte, gegebenenfalls sogar am Aufnahmeprozess in die Membran. Bereits früher gelangten Studien zu dem Schluss, dass ein Teil der Morbus Best verursachenden Punktmutationen zu einer mangelhaften Membraninsertion des Bestrophin-1 führt (V. M. Milenkovic *et al.*, 2007; Mullins *et al.*, 2005). In den Immunfärbungen stellte sich die Situation in dieser Arbeit etwas anders dar (s. Kap. 3.3). Bezüglich der Verteilung der defekten Proteine gilt dabei zu bedenken, dass lediglich eine optische Beurteilung vorgenommen und in denselben Zellen nicht gleichzeitig ein Membranmarker angefärbt wurde. Auffällig sind jedoch die Resultate der Analyse der Kolokalisation zwischen der jeweiligen Bestrophin-1-Form und Rab27a, die wenig mit den Resultaten der Koimmunpräzipitationsexperimente korrelieren. So kolokalisiert bei relativ guter Interaktionsfähigkeit etwa nur ein vergleichsweise kleiner Anteil von F80L mit Rab27a. Dies bekräftigt erneut die Erkenntnis, dass der subzelluläre Transport von Bestrophin-1 bei Vorliegen einer BVMD-verursachenden Punktmutation über Mechanismen gestört ist, die über die abgeschwächte Interaktion mit Rab27a hinausgehen. Es ist beispielsweise bekannt, dass N-terminale Enden häufig an der Verpackung von Proteinen in Vesikel

beteiligt sind (von Heijne, 1996). Das könnte auch bei Bestrophin-1 zutreffen und einen Mechanismus darstellen, wie der Aminosäureaustausch von Bestrophin-1-T6P den Bestrophin-1-Transport zur Zellmembran stört. Nichtsdestoweniger ist die Protein/Protein-Interaktion mit Rab27a bei mutiertem Bestrophin-1 beeinträchtigt und behindert das zelluläre Trafficking vermutlich zusätzlich. Es stellt sich die Frage, wie es zu der schwächeren Bindung kommt. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure reicht in manchen Fällen aus, die Effizienz der Faltung eines Proteins um 40 % zu reduzieren (Guerois *et al.*, 2002). Eine veränderte Tertiärstruktur könnte erklären, wie Mutationen an so unterschiedlichen Stellen eine starke Einschränkung der Interaktion mit dem gleichen Rab-Protein verursachen können. Eine Reihe genetischer Erkrankungen beruht erwiesenermaßen auf Fehlfaltung von Proteinen. Beispielsweise wird die zystische Fibrose durch falsch gefalteten CFTR hervorgerufen (Bross *et al.*, 1999; Valastyan & Lindquist, 2014). Möglicherweise gibt es aber unterschiedliche ursächliche Mechanismen für die verschiedenen Mutanten. Dies könnte zum Beispiel für die Mutante F305S der Fall sein. Der Aminosäureaustausch F305S liegt meinen Daten zufolge potentiell im Bereich der Rab27a-Interaktionsdomäne (s. Kap. 4.2.3), wodurch die Bindung direkt behindert werden könnte. Es ist möglich, dass die Interaktion des mutierten Bestrophin-1 mit Rab27a in situ durch eine verringerte Kolo-kalisation bedingt durch Veränderung anderer Transportprozesse zusätzlich beeinträchtigt ist.

4.3.1 Bestrophin-1/Rab27a-Interaktion bei Koexpression von Bestrophin-1-Wt und Bestrophin-1-Mutanten

Um den tatsächlichen autosomal-dominanten Vererbungsmodus zu simulieren, wurden CHO-Zellen „autosomal-dominant“ jeweils mit Rab27a, dem Bestrophin-1-Wt und einer Bestrophin-1-Mutante tripletransfiziert. Dies entsprach jedoch nicht primär der Fragestellung der vorliegenden Arbeit, sodass die Experimente bisher nur exemplarisch durchgeführt wurden und zur abschließenden Klärung weitere Versuche folgen müssten. Es wurden bewusst die beiden Mutanten ausgesucht, bei denen basierend auf den Ergebnissen der vorherigen Versuche ein Effekt erwartet wurde. Dabei wurde eine starke Einschränkung der Kopräzipitation des Bestrophin-1 mit Rab27a festgestellt. Bei der Mutante T6P war diese nicht geringer als bei Koimmunpräzipitation von T6P und Rab27a ohne Bestrophin-1-Wt. Für Bestrophin-1-F305S traf das lediglich auf einen der beiden quantitativ ausgewerteten Versuche zu. Bei zwei weiteren Versuchen waren die Banden insgesamt sehr schwach und keine IP-Bande sichtbar, sodass eine quantitative

Auswertung nicht möglich war. Jedoch war die Interaktion in diesen Fällen offensichtlich ebenfalls sehr eingeschränkt. Das mutante Bestrophin-1 dominierte in diesen Zellen folglich über den Einfluss der nach der Transfektion ebenfalls vorhandenen wildtypischen Bestrophin-1-Variante. Damit war vermutlich eine Imitation des Mechanismus gelungen, der auch bei den Patienten zur Erkrankung führt, obgleich sie im Besitz eines gesunden Allels sind. Dieser dominant-negative Effekt konnte bereits zuvor von einigen Gruppen experimentell nachgestellt werden. So stellte die Arbeitsgruppe um Jeremy Nathans 2002 bei Doppeltransfektion von Bestrophin-1-Wt und vier BVMD-assoziierten Punktmutanten in Patch-Clamp-Experimenten im Whole-Cell-Modus verminderte Ströme fest, die den Strömen nach Einfachtransfektion der Mutanten entsprachen. Es wurde spekuliert, dass normale und mutante Bestrophine oligomerisieren und gemeinsam weniger funktionsfähige Ionenkanäle bilden (Sun *et al.*, 2002). Johnson *et al.* testeten diese Hypothese und fanden, dass die Oligomerisierung von Bestrophin-1-Wt mit mutantem Bestrophin-1 möglich ist. Sie zeigten außerdem eine Mislokalisierung von Bestrophin-1-Wt in Anwesenheit von manchen Mutanten (Johnson *et al.*, 2013).

Einschränkend muss gesagt werden, dass es allein anhand der Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen nicht möglich ist, eine Unterscheidung zwischen wildtypischem und mutantem Bestrophin zu treffen und festzustellen, ob einander entsprechende Expressionslevel für beide Formen vorlagen. Das stöchiometrische Verhalten von Bestrophin-1-Wt und mutanten Formen, mit dem Wt-Bestrophine und Mutanten Pentamere untereinander bilden, ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt. Alle bisher diesbezüglich untersuchten Mutanten, darunter T6P, scheinen in der Lage zu sein, weiterhin mit Bestrophin-1-Wt zu oligomerisieren (Johnson *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2014). Es bestehen jedoch zahlreiche Möglichkeiten, wie sich die Komplexe zusammensetzen, was zudem innerhalb der einzelnen Zelle und zwischen den verschiedenen Mutanten variieren könnte. Während Bestrophin-1-Wt Pentamere bildet, ist vorstellbar, dass einzelne Mutationen eventuell zu einer Komplexbildung mit einer falschen Anzahl an Protomeren führen (Johnson *et al.*, 2017). Diese Fragen sind möglicherweise nur anhand von Patientendaten zu beantworten. Bevor über die Stöchiometrie Klarheit besteht, ist es schwer zu sagen, wie genau es zu der Abschwächung der Bestrophin-1/Rab27a-Interaktion kommt. Die Ergebnisse der in dieser Studie durchgeführten Experimente lassen dazu keine Aussage zu. Schlechteres Trafficking und weniger reguläres Bestrophin-1 am Wirkort könnten eine Rolle spielen.

Es handelt sich dabei um einen üblichen Vorgang bei autosomal-dominanten Erkrankungen, der als Haploinsuffizienz bezeichnet wird. Haploinsuffizienz wurde in der Vergangenheit als zugrundeliegender Mechanismus bei ein paar Bestrophin-1-Mutanten vermutet (Hartzell *et al.*, 2008; Krämer *et al.*, 2003). Wäre das der einzige Grund für die verminderte Wechselwirkung mit Rab27a, wäre jedoch eine bessere Interaktionsfähigkeit zu erwarten, die irgendwo zwischen der tatsächlich nachgewiesenen und der des Bestrophin-1-Wt angesiedelt sein müsste. Zudem wiesen *mBest1*-knockout-Mäusen keinerlei okuläre Pathologie auf (L. Y. Marmorstein *et al.*, 2006). Daraus lässt sich schließen, dass die mutierte Form auf eine noch nicht definierte Weise zusätzlich aktiv interferieren muss. Zu diesem Ergebnis kamen bereits andere Forschungsgruppen. Es wurden dominant-negative Effekte durch Inhibierung der Cl⁻-Kanalfunktion als Folge einer Oligomerisierung aus mutantern und wildtypischem Bestrophin-1 oder Funktionsgewinn aufgrund der Mutationen vorgeschlagen (Hartzell *et al.*, 2008; Krämer *et al.*, 2003).

In einem der Versuche verhielt sich das Bestrophin nach Doppeltransfektion von Bestrophin-1-F305S und Bestrophin-1-Wt in der Koimmunpräzipitation mit Rab27a dagegen wie der Wildtyp und kopräzipitierte gleichermaßen effizient. Angesichts der übrigen Resultate wurde vermutet, dass ein methodisches Problem bei der Transfektion von hBest1 F305S vorlag und die Zellen tatsächlich nur wildtypisches Bestrophin-1 exprimierten. Aus einem bislang unbekanntem Grund erfolgt die Ausbildung des Phänotyps der BVMD jedoch mit reduzierter Penetranz (Boon *et al.*, 2009). Tatsächlich sind für F305S sowohl Fälle mit typisch verändertem Hellanstieg im EOG als auch Fälle mit normalem EOG oder Fundusasymmetrie beschrieben, was auf diese reduzierte Penetranz hindeutet. Es wurde eine Einflussnahme des gesunden Allels vermutet (Low *et al.*, 2011). Die schlechte Penetranz kann jedoch auch auf der individuellen Expressionshäufigkeit der Bestrophine oder den individuellen Fähigkeiten zum Abbau der mutanten Bestrophine beruhen. Bei den Experimenten *in vitro* können diese Punkte eher keine Rolle spielen, da in jedem Fall das gleiche Plasmid sowie CHO-Zellen aus derselben Zelllinie verwendet wurden. Bei der sicheren Abgrenzung zwischen einem methodischen Problem und einem tatsächlichen Effekt stellt indes die geringe Anzahl der Versuche ein Problem dar, wie es bereits anhand der Deletionsmutanten erörtert wurde (s. Kap. 4.2.1). Um herauszufinden, ob es sich bei einem der Ergebnisse um einen Ausreißer handelt, sollte das Experiment mehrfach wiederholt werden.

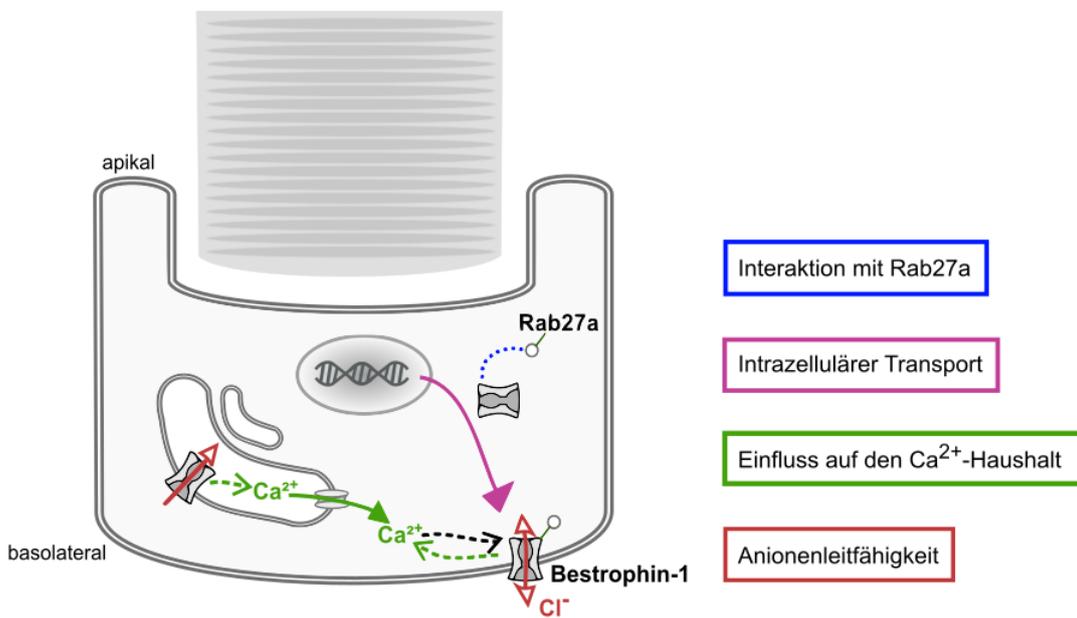
4.4 Fazit und mögliche Rolle von Rab27a in der Pathogenese der BVMD

Zusammenfassend gelang es in der vorliegenden Studie, eine Interaktion zwischen Rab27a und Bestrophin-1 festzustellen. Es konnten zwei Bereiche identifiziert werden, in denen potentiell Bindungsdomänen liegen. Um die Art der Interaktion genau zu definieren, wurde jedoch bisher zu grob untersucht. Eine indirekte Interaktion ist nicht auszuschließen. Möglicherweise spielt Ca^{2+} hierbei eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass bei Morbus Best vorkommende Missense-Mutationen die Bindung negativ beeinflussen, woraus sich eine potentielle Rolle von Rab27a in der Pathogenese der BVMD ableiten lässt. Zwei der Punktmutanten wurden mit dem Wildtyp koexprimiert und inhibierten dabei passend zum autosomal-dominanten Vererbungsmodus der Erkrankung die wildtypische Interaktion mit Rab27a. Alle untersuchten Punktmutanten sind weniger membrangängig als Bestrophin-1-Wt. Der N-Terminus und der Bereich zwischen Aminosäure 457-575 scheinen hierbei von besonderer Relevanz zu sein. Zwischen den Ergebnissen der vier untersuchten krankheitsassoziierten Bestrophin-1-Mutanten bestanden erhebliche Diskrepanzen sowohl in Bezug auf die subzelluläre Verteilung als auch bezüglich der Effizienz der Koimmunpräzipitation.

Der Nachweis einer physikalischen Wechselwirkung von Bestrophin-1 und Rab27a gelang bereits in HEK293-, nativen humanen RPE- und jetzt in CHO-Zellen, sodass die Frage nach der physiologischen Rolle dieser Interaktion aufkommt. Rab27a ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Eine Interaktion mit verschiedenen anderen Ionenkanälen ist bekannt, darunter mit CFTR einer, der viele Ähnlichkeiten zu Bestrophin-1 besitzt. In diesen Fällen wirkt sich Rab27a jeweils negativ auf die Leitfähigkeit aus, was im Fall von CFTR durch Effektorproteine aufgehoben werden kann. Ebenso verhält es sich beim ENaC. Dies ist vermutlich einer größeren Affinität von Rab27a zu den Effektorproteinen geschuldet, wodurch die Bindung an das Kanalprotein gehemmt wird (Saxena *et al.*, 2006; Saxena & Kaur, 2006b; Saxena *et al.*, 2005). Eine Beeinflussung auch der Kanaleigenschaften des Bestrophin-1 liegt daher nahe, welche jedoch in der vorliegenden Studie nicht näher betrachtet wurden. Bei Rab27a handelt es sich um ein Transportprotein (Ali & Seabra, 2005; Hutagalung & Novick, 2011; Stenmark & Olkkonen, 2001). In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass mutiertes Bestrophin-1 sowohl schlechter mit Rab27a interagiert als auch weniger effizient an den Zielort transportiert wird. Eine Retention von fehlerhaftem Bestrophin-1 im Zytoplasma wurde bereits beschrieben (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b; Mullins *et al.*, 2005). In dieser Konstellation

muss an eine Beteiligung von Rab27a am subzellulären Bestrophin-1-Transport gedacht werden. Analog zur üblichen Funktionsweise von Rab27a könnte die schwächere Bindung bei den Punktmutanten etwa die Membraninsertion beeinträchtigen. Weniger funktionelles Bestrophin-1 am Zielort wirkt sich negativ auf die verschiedenen Proteinfunktionen aus und könnte damit zum Beispiel einen Beitrag zu der reduzierten Anionenleitfähigkeit und dem veränderten Ca^{2+} -Signalling bei Morbus Best leisten. Möglicherweise ist die Bestrophin-1/Rab27a-Interaktion Ca^{2+} -abhängig, sodass ein Circulus vitiosus resultieren könnte. Eine Übersicht über die Funktionsausfälle von Bestrophin-1 findet sich in Abb. 4.4.

A



B

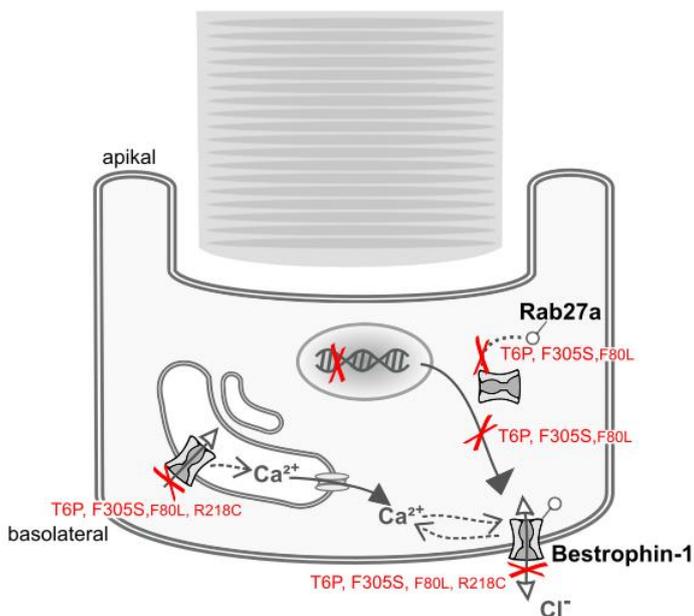


Abb. 4.4: Intrazelluläre Stationen von Bestrophin-1. A: Schematische Darstellung der physiologischen Vorgänge, in die Bestrophin-1 nach derzeitigem Kenntnisstand involviert ist. **B:** Einschränkungen und Funktionsausfälle von mutiertem Bestrophin-1. Der jeweilige Ausprägungsgrad ist abhängig von der vorliegenden Mutation.

Bei der BVMD ist die Phagozytose im RPE gestört (Boon *et al.*, 2009; Guziwicz *et al.*, 2017). Rab27a spielt eine Rolle in lysosomalem Transport und Exozytoseprozessen. Wenngleich dieser Zusammenhang ursprünglich in hämatopoetischen Zellen festgestellt wurde, scheint er neueren Untersuchungen zufolge auch in anderen Zelltypen zu bestehen (Elstak *et al.*, 2011; Laulagnier *et al.*, 2011; Neeft *et al.*, 2004). Rab27a wirkt negativ regulatorisch auf Phagozytoseprozesse. In Knockdown-Zellen wie auch beim Griscelli-Syndrom mit Funktionsverlust des Rab-Proteins zeigt sich eine Steigerung der Phagozytose (Yokoyama *et al.*, 2011). In primären Schweine-RPE-Zellen wurde ein inhibitorischer Effekt von Bestrophin-1 auf die Phagozytose nachgewiesen, wahrscheinlich vermittelt über eine Regulierung der Ca^{2+} -Konzentration. In zwei Knockout-Mausmodellen wurde *in vivo* ein Einfluss von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen auf den streng regulierten zirkadianen Rhythmus der Phagozytoseaktivität gezeigt. Über eine Regulation dieser Kanäle kann sich auch Bestrophin-1 darauf auswirken (Müller *et al.*, 2014). Somit sind beide Proteine, die an der untersuchten Interaktion teilhaben, mit Phagozytoseprozessen assoziiert. Es wäre folglich naheliegend, dass die Wechselwirkung beider eine Funktion in der Phagozytose durch das RPE erfüllt und eine Störung derselben eine Rolle in der Entstehung der Lipofuszinakkumulation bei BVMD spielt. Die genauen physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge sind allerdings bisher nicht bekannt und können nur *in vivo* näher bestimmt werden.

Es bestanden erhebliche Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der verschiedenen krankheitsverursachenden Bestrophin-1-Mutanten einerseits und zwischen den Ergebnissen der Koimmunpräzipitation und der Immunzytochemie andererseits. Rab27a kommt demnach nicht als einzelner Faktor für die Krankheitsentstehung infrage. Dafür spricht auch, dass funktioneller Mangel an Rab27a durch verminderte Geranylgeranylierung zu Chorioideremie, nicht aber zu Morbus Best führt (Seabra *et al.*, 1995). Nach derzeitigem Kenntnisstand erscheint es am wahrscheinlichsten, dass bei den verschiedenen Mutanten unterschiedliche Mechanismen in der Pathogenese der BVMD zum Tragen kommen. Zu diesem Schluss kamen bereits andere Arbeitsgruppen

(V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b). Die in dieser Arbeit untersuchte Interaktion könnte insbesondere bei den Bestrophin-1-Mutanten T6P und F305S relevant sein. Bei der Mutante R218C scheinen die Interaktion mit Rab27a und ein veränderter Transport dagegen in der Pathogenese der BVMD keine große Rolle zu spielen. Diese Mutante ist interessant, weil sie sich unter sämtlichen bisher untersuchten Bedingungen bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation beinahe wie der Wildtyp verhält. Milenkovic *et al.* mutmaßten, dass bei ihr die verminderte Anionenleitfähigkeit der entscheidende Mechanismus ist (V. M. Milenkovic *et al.*, 2011b). Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Studie liefern keinen Hinweis dafür, dass diese Annahme falsch ist. Für Patienten mit Mutationen, bei denen die Rab27a-Interaktion eingeschränkt ist, lohnt es sich zu prüfen, ob sie in Zukunft als Angriffspunkt für Therapien genutzt werden kann.

4.5 Weiterer Forschungsbedarf

In weiterführenden Forschungsarbeiten müsste zunächst die Frage geklärt werden, in welchem Prenylierungszustand von Rab27a die Interaktion mit Bestrophin-1 stattfindet und wie es in den CHO-Zellen vorliegt. Dann sollten die bisher nicht betrachteten Areale von Bestrophin-1 nach einer Rab27a-bindenden Domäne durchsucht werden. Hierzu könnten analog zu den bisherigen Versuchen Deletionsmutanten hergestellt werden, denen die entsprechenden Sequenzen fehlen, und die dann in Koimmunpräzipitationsexperimenten untersucht werden. Entfernt man den gesuchten Bindungsbereich, ist keine weitere Kopräzipitation der beiden Proteine zu erwarten. Für eine exaktere Bestimmung relevanter Bereiche könnte in Sequenzalignmentstudien nach etwaigen Bindungsdomänen gesucht werden. Hierbei sollte ein dreidimensionales Modeling erfolgen und in Betracht gezogen werden, dass die einzelnen beteiligten Aminosäuren in der Primärstruktur nicht unbedingt benachbart sein müssen und eventuell erst in der Tertiärstruktur eine Bindungsdomäne formen. Auch die Möglichkeit einer indirekten Interaktion darf nicht außer Acht gelassen werden. Dies gilt insbesondere, falls im Sequenzalignment keine potentielle Interaktionsdomäne zu identifizieren ist. Ein besonderes Augenmerk sollte dann auf die bekannten Rab27a-Effektoren gelegt werden. Um herauszufinden, ob die Interaktion tatsächlich Ca^{2+} -abhängig ist, sollte den Inkubationslösungen Ca^{2+} entzogen und die Experimente unter Ca^{2+} -freien Bedingungen wiederholt werden. Von Interesse wäre vor allem die Koimmunpräzipitation von Rab27a und Bestrophin-1-Wt sowie einer Mutante, bei der wenig mehr als die Ca^{2+} -Bindungsstelle erhalten ist. Von den in der vorliegenden Arbeit

zur Verfügung stehenden Deletionsmutanten eignet sich zu diesem Zweck am besten hBest1del 1-292 + 457-575. Zur Weiterverfolgung der Hypothese, dass Rab27a die Lokalisation von Bestrophin-1 beeinflusst, wäre es hilfreich, immunzytochemische Färbungen von Zellen durchzuführen, die mit Bestrophin-1 gemeinsam mit und ohne Rab27a transfiziert wurden. Genauso sollte untersucht werden, ob die Leitfähigkeiten von Bestrophin-1 in seiner Rolle als Ionenkanal oder seine regulatorischen Funktionen in Anwesenheit von Rab27a verändert sind. Um die tatsächliche Relevanz der beobachteten Wechselwirkung zu determinieren und eventuelle Einflüsse der Überexpression beispielsweise auf die subzelluläre Lokalisation auszuschließen, müssten die Experimente in situ wiederholt werden. Idealerweise stünde dafür humanes RPE von Gesunden und von Betroffenen zur Verfügung. Dieses kann zum Beispiel bei Hornhauttransplantationen gewonnen werden. Mithilfe von Kristallstrukturanalysen wäre es anhand solcher Proben außerdem möglich, das stöchiometrische Verhalten von Bestrophin-1 bei Vorliegen verschiedener Mutationen aufzuklären, was wertvolle neue Erkenntnisse über mögliche Pathomechanismen der BVMD erbringen könnte. In Tiermodellen wäre das Verhalten und die Lokalisation von Bestrophin-1 nach Rab27a-siRNA-Knockdown aufschlussreich. Die Versuche bezüglich des dominanten Vererbungsmodus müssten wiederholt werden. Der Nachweis der doppelten Interaktion zwischen Bestrophin-1/Ca_v1.3 sowie Ca_v1.3/Rab27a lässt die Frage nach einer etwaigen wechselseitigen Beeinflussung aller drei Proteine (Tripleinteraktion) aufkommen. Dieser Frage kann in weiterführenden Experimenten nachgegangen werden. Dabei gilt es beispielsweise zu beantworten, ob sich die Anwesenheit von Rab27a auf die Interaktion zwischen Bestrophin-1 und Ca_v1.3 auswirkt, etwa durch eine veränderte subzelluläre Verteilung der beiden Proteine. Zur abschließenden Klärung der pathophysiologischen Vorgänge, die zum Krankheitsbild der BVMD führen, müssen in Zukunft weitere Interaktionspartner von Bestrophin-1 identifiziert werden. Interessant wäre insbesondere, ob außer Rab27a auch andere Rab-Proteine dazugehören.

Literaturverzeichnis

- Abderrahmani A, Cheviet S, Ferdaoussi M, Coppola T, Waeber G, Regazzi R. ICER induced by hyperglycemia represses the expression of genes essential for insulin exocytosis. *EMBO J* 2006; 25(5):977-986.
- Aizawa T, Komatsu M. Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J Clin Invest* 2005; 115(2):227-230.
- Ali BR, Seabra MC. Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 4):652-656.
- Andrade RE, Farah ME, Cardillo JA, Höfling-Lima AL, Uno F, Costa RA. Optical coherence tomography in choroidal neovascular membrane associated with Best's vitelliform dystrophy. *Acta Ophthalmol Scand* 2002; 80(2):216-218.
- Bahadoran P, Aberdam E, Mantoux F, Buscà R, Bille K, Yalman N, de Saint-Basile G, Casaroli-Marano R, Ortonne JP, Ballotti R. Rab27a: a key to melanosome transport in human melanocytes. *J Cell Biol* 2001; 152(4):843-850.
- Bakall B, McLaughlin P, Stanton JB, Zhang Y, Hartzell HC, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Bestrophin-2 is involved in the generation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(4):1563-1570.
- Barral DC, Ramalho JS, Anders R, Hume AN, Knapton HJ, Tolmachova T, Collinson LM, Goulding D, Authi KS, Seabra MC. Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J Clin Invest* 2002; 110(2):247-257.
- Barro-Soria R, Aldehni F, Almaça J, Witzgall R, Schreiber R, Kunzelmann K. ER-localized Bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel. *Pflugers Arch* 2010; 459(3):485-497.
- Barro-Soria R, Spitzner M, Schreiber R, Kunzelmann K. Bestrophin-1 enables Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in epithelia. *J Biol Chem* 2009; 284(43):29405-29412.
- Best F. Über eine hereditäre Maculaaffektion. *Zeitschrift für Augenheilkunde* 1905; 13:199-212.
- Bitner H, Schatz P, Mizrahi-Meissonier L, Sharon D, Rosenberg T. Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark. *Am J Ophthalmol* 2012; 154(2):403-412.
- Boon CJ, Klevering BJ, Leroy BP, Hoyng CB, Keunen JE, den Hollander AI. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(3):187-205.
- Boudes M, Sar C, Menigoz A, Hilaire C, Péquignot MO, Kozlenkov A, Marmorstein A, Carroll P, Valmier J, Scamps F. Best1 is a gene regulated by nerve injury and required for Ca²⁺-activated Cl⁻ current expression in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 2009; 29(32):10063-10071.

- Bross P, Corydon TJ, Andresen BS, Jørgensen MM, Bolund L, Gregersen N. Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mut* 1999; 14(3):186-198.
- Burgess R, Millar ID, Leroy BP, Urquhart JE, Fearon IM, De Baere E, Brown PD, Robson AG, Wright GA, Kestelyn P, Holder GE, Webster AR, Manson FD, Black GC. Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *Am J Hum Genet* 2008; 82(1):19-31.
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322(5901):590-594.
- Dalvin LA, Pulido JS, Marmorstein AD. Vitelliform dystrophies: Prevalence in Olmsted County, Minnesota, United States. *Ophthalmic Genet* 2017; 38(2):143-147.
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* 2001; 293(5527):98-101.
- Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, Burgess-Mullan R, Shweikh Y, Parry N, O'Sullivan J, Maher GJ, McKibbin M, Downes SM, Lotery AJ, Jacobson SG, Brown PD, Black GC, Manson FD. Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, Bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2009; 85(5):581-592.
- Dong W, Cui J, Yang J, Li W, Wang S, Wang X, Li X, Lu Y, Xiao W. Decreased expression of Rab27a and Rab27b correlates with metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Discov Med* 2015; 20(112):357-367.
- Duran C, Chien LT, Hartzell HC. Drosophila bestrophin-1 currents are regulated by phosphorylation via a CaMKII dependent mechanism. *PLoS One* 2013; 8(3):e58875.
- Elstak ED, Neeft M, Nehme NT, Voortman J, Cheung M, Goodarzifard M, Gerritsen HC, van Bergen En Henegouwen PM, Callebaut I, de Saint Basile G, van der Sluijs P. The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood* 2011; 118(6):1570-1578.
- Fischmeister R, Hartzell HC. Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels. *J Physiol* 2005; 562(Pt 2):477-491.
- Fukuda M. Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(18):2801-2813.
- Fukuda M. Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J Biochem* 2005; 137(1):9-16.
- Gordiyenko NV, Fariss RN, Zhi C, MacDonald IM. Silencing of the CHM gene alters phagocytic and secretory pathways in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(2):1143-1150.
- Guerois R, Nielsen JE, Serrano L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *J Mol Biol* 2002; 320(2):369-387.

- Guziewicz KE, Sinha D, Gómez NM, Zorych K, Dutrow EV, Dhingra A, Mullins RF, Stone EM, Gamm DM, Boesze-Battaglia K, Aguirre GD. An RPE-photoreceptor interface disease. *Prog Retin Eye Res* 2017; 58:70-88.
- Haddad EK, Wu X, Hammer JA, Henkart PA. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J Cell Biol* 2001; 152(4):835-842.
- Hartzell C, Qu Z, Putzier I, Artinian L, Chien LT, Cui Y. Looking chloride channels straight in the eye: bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20:292-302.
- Hartzell HC, Qu Z, Yu K, Xiao Q, Chien LT. Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol Rev* 2008; 88(2):639-672.
- Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 2011; 91(1):119-149.
- Izumi T. Physiological roles of Rab27 effectors in regulated exocytosis. *Endocr J* 2007; 54(5):649-657.
- Jancic C, Savina A, Wasmeier C, Tolmachova T, El-Benna J, Dang PM, Pascolo S, Gougerot-Pocidallo MA, Raposo G, Seabra MC, Amigorena S. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol* 2007; 9(4):367-378.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82(2):503-568.
- Johnson AA, Guziewicz KE, Lee CJ, Kalathur RC, Pulido JS, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Bestrophin 1 and retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 2017; 58:45-69.
- Johnson AA, Lee YS, Chadburn AJ, Tammaro P, Manson FD, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1. *Exp Eye Res* 2014; 121:74-85.
- Johnson AA, Lee YS, Stanton JB, Yu K, Hartzell CH, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. *Hum Mol Genet* 2013; 22(23):4688-4697.
- Kane Dickson V, Pedi L, Long SB. Structure and insights into the function of a Ca²⁺ activated Cl⁻ channel. *Nature* 2014; 516(7530):213-218.
- Kawakami T, He J, Morita H, Yokoyama K, Kaji H, Tanaka C, Suemori S, Tohyama K, Tohyama Y. Rab27a is essential for the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in neutrophil-like differentiated HL60 cells. *PLoS One* 2014; 9(1):e84704.
- Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond)* 1995; 9(Pt6):763-771.

- Kintaka R, Makanae K, Moriya H. Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes. *Sci Rep* 2016; 6:31774.
- Kolb H. "Gross anatomy of the eye". *Webvision*. Moran Eye Center 2012. Web. (Accessed Jun 23, 2017, at <http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/gross-anatomy-of-the-eye/>.)
- Kolb H. "Simple anatomy of the retina". *Webvision*. Moran Eye Center 2011. Web. (Accessed Jun 23, 2017, at <http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/simple-anatomy-of-the-retina/>.)
- Krämer F, Mohr N, Kellner U, Rudolph G, Weber BH. Ten novel mutations in VMD2 associated with Best macular dystrophy (BMD). *Hum Mutat* 2003; 22(5):418.
- Kranjc A, Grillo FW, Rievaj J, Boccaccio A, Pietrucci F, Menini A, Carloni P, Anselmi C. Regulation of bestrophins by Ca²⁺: a theoretical and experimental study. *PLoS One* 2009; 4(3):e4672.
- Kuo YH, Abdullaev IF, Hyzinski-Garcia MC, Mongin A. Effects of alternative splicing on function of Bestrophin-1 calcium-activated chloride channels. *Biochem J* 2014; 458(3):575-583.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Laulagnier K, Schieber NL, Maritzen T, Hauce V, Parton RG, Gruenberg J. Role of AP1 and Gadkin in the traffic of secretory endo-lysosomes. *Mol Biol Cell* 2011; 22(12):2068-2082.
- Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ. Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 2010; 330(6005):790-796.
- Leiden University Medical Center. BEST 1 Database. LOVD Gene homepage. Web. (Accessed Jan 21, 2017, at http://www-huge.uni-regensburg.de/BEST1_database/home.php?select_db=BEST1.)
- Leu J, Schrage NF, Degenring RF. Choroidal neovascularisation secondary to Best's disease in a 13-year-old boy treated by intravitreal bevacizumab. *Graefers Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(11):1723-1725.
- Low S, Davidson AE, Holder GE, Hogg CR, Bhattacharya SS, Black GC, Foster PJ, Webster AR. Autosomal dominant Best disease with an unusual electrooculographic light rise and risk of angle-closure glaucoma: a clinical and molecular study. *Mol Vis* 2011; 17:2272-2282.
- Marmorstein AD, Cross HE, Peachey NS. Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(3):206-226.
- Marmorstein AD, Kinnick TR, Stanton JB, Johnson AA, Lynch RM, Lihua YM. Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis* 2015; 21:347-359.
- Marmorstein AD, Marmorstein LY, Rayborn M, Wang X, Hollyfield JG, Petrukhin K. 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* 2000; 97(23):12758-12763.
- Marmorstein AD, Stanton JB, Yocom J, Bakall B, Schiavone MT, Wadelius C, Marmorstein LY, Peachey NS. A model of best vitelliform macular dystrophy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(10):3733-3739.
- Marmorstein LY, Wu J, McLaughlin P, Yocom J, Karl MO, Neussert R, Wimmers S, Stanton JB, Gregg RG, Strauss O, Peachey NS, Marmorstein AD. The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1). *J Gen Physiol* 2006; 127(5):577-589.
- Marquardt A, Stöhr H, Passmore LA, Krämer F, Rivera A, Weber BH. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet* 1998; 7(9):1517-1525.
- Masland RH. The neuronal organization of the retina. *Neuron* 2012; 76(2):266-280.
- Ménasché G, Pastural E, Feldmann J. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 2000; 25(2):173-176.
- Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, Jendryke T, Sirianant L, Wanitchakool P, Zimmermann S, Reiff CM, Horling F, Schrewe H, Schreiber R, Kunzelmann K, Wetzel CH, Weber BH. Bestrophin-1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(20):E2630-E2639.
- Milenkovic VM, Krejcova S, Reichhart N, Wagner A, Strauss O. Interaction of bestrophin-1 and Ca²⁺ channel β -subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus. *PLoS One* 2011a; 6(4):e19364.
- Milenkovic VM, Rivera A, Horling F, Weber BHF. Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 2007; 282:1313-1321.
- Milenkovic VM, Röhrl E, Weber BHF, Strauss O. Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. *J Cell Sci* 2011b; 124:2988-2996.
- Moriya H. Quantitative nature of overexpression experiments. *Mol Biol Cell* 2015; 26(22):3932-3939.
- Moshfegh Y, Velez G, Li Y, Bassuk AG, Mahajan VB, Tsang SH. BESTROPHIN1 mutations cause defective chloride conductance in patient stem cell-derived RPE. *Hum Mol Genet* 2016; 25(13):2672-2680.
- Moskova-Doumanova V, Pankov R, Lalchev Z, Doumanov J. Best1 shot through the eye – structure, functions and clinical implications of bestrophin-1 protein. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2013; 27:3457-3464.

- Müller C, Más Gómez N, Ruth P, Strauss O. CaV1.3 L-type channels, maxiK Ca²⁺-dependent K⁺ channels and Bestrophin-1 regulate rhythmic photoreceptor outer segment phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *Cell Signal* 2014; 26(5):968-978.
- Mullins RF, Kuehn MH, Faidley EA, Syed NA, Stone EM. Differential macular and peripheral expression of bestrophin in human eyes and its implication for best disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(7):3372-3380.
- Mullins RF, Oh KT, Heffron E, Hageman GS, Stone EM. Late development of vitelliform lesions and flecks in a patient with best disease: clinicopathologic correlation. *Arch Ophthalmol* 2005; 123(11):1588-1594.
- Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 1996; 5(12):2375-2390.
- Neeft M, Wieffer M, de Jong AS, Negroiu G, Metz CH, van Loon A, Griffith J, Krijgsveld J, Wulffraat N, Koch H, Heck AJ, Brose N, Kleijmeer M, van der Sluijs P. Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16(2):731-741.
- Nelson MR, Chazin WJ. Structures of EF-hand Ca²⁺ binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding. *Biometals* 1998; 11(4):297-318.
- Neussert R, Müller C, Milenkovic VM, Strauss O. The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER. *Pflugers Arch* 2010; 460(1):163-175.
- Nordström S. Hereditary macular degeneration – a population survey in the county of Västerbotten, Sweden. *Hereditas* 1974; 78(1):41-62.
- O’Gorman S, Flaherty WA, Fishman GA, Berson EL. Histopathologic findings in Best’s vitelliform macular dystrophy. *Arch Ophthalmol* 1988; 106(9):1261-1268.
- Park H, Oh SJ, Han KS, Woo DH, Park H, Mannaioni G, Traynelis SF, Lee CJ. Bestrophin-1 encodes for the Ca²⁺-activated anion channel in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 2009; 29(41):13063-13073.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 2001; 313(4):889-901.
- Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, Sandgren O, Forsman K, Holmgren G, Andreasson S, Vujic M, Bergen AA, McGarty-Dugan V, Figueroa D, Austin CP, Metzker ML, Caskey CT, Wadelius C. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 19:241-247.
- Pfeffer SR. Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J Biol Chem* 2005; 280(16):15485-15488.
- Qu Z, Hartzell HC. Bestrophin Cl⁻ channels are highly permeable to HCO₃⁻. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294(6):C1371-C1377.

- Qu Z, Wei RW, Mann W, Hartzell HC. Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca²⁺-activated Cl⁻ currents. *J Biol Chem* 2003; 278(49):49563-49572.
- Ramalho JS, Tolmachova T, Hume AN, McGuigan A, Gregory-Evans K, Huxley C, Seabra MC. Chromosomal mapping, gene structure and characterization of the human and murine RAB27B gene. *BMC Genetics* 2001; 2:2.
- Reichhart N, Markowski M, Ishiyama S, Wagner A, Crespo-Garcia S, Schorb T, Ramalho JS, Milenkovic VM, Föckler R, Seabra MC, Strauß O. Rab27a GTPase modulates L-type Ca²⁺ channel function via interaction with the II-III linker of CaV1.3 subunit. *Cell Signal* 2015; 27(11):2231-2240.
- Reichhart N, Milenkovic VM, Halsband CA, Cordeiro S, Strauss O. Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit. *Exp Eye Res* 2010; 91(5):630-639.
- Rosenthal R, Bakall B, Kinnick T, Peachey N, Wimmers S, Wadelius C, Marmorstein A, Strauss O. Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *FASEB J* 2006; 20(1):178-180.
- Rosenthal R, Strauss O. Ca²⁺-channels in the RPE. *Adv Exp Med Biol* 2002; 514:225-235.
- Saxena SK, Horiuchi H, Fukuda M. Rab27a regulates epithelial sodium channel (ENaC) activity through synaptotagmin-like protein (SLP-5) and Munc13-4 effector mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2006a; 344(2):651-657.
- Saxena SK, Singh M, Engisch K, Fukuda M, Kaur S. Rab proteins regulate epithelial sodium channel activity in colonic epithelial HT-29 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(4):1219-1223.
- Saxena SK, Kaur S. Rab27a negatively regulates CFTR chloride channel function in colonic epithelia: involvement of the effector proteins in the regulatory mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2006b; 346(1):259-267.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 2008; 134(6):1019-1029.
- Seabra MC, Ho YK, Anant JS. Deficient geranylgeranylation of Ram/Rab27 in choroideremia. *J Biol Chem* 1995; 270(41):24420-24427.
- Seabra MC, Mules EH, Hume AN. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* 2002; 8(1):23-30.
- Sparrow JR, Boulton M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res* 2005; 80(5):595-606.
- Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 2010; 10(9):802-823.
- Stanton JB, Goldberg AF, Hoppe G, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Hydrodynamic properties of porcine Bestrophin-1 in Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758(2):241-247.

- Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2001; 2(5):reviews3007.
- Stöhr H, Marquardt A, Nanda I, Schmid M, Weber BH. Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(4):281-284.
- Stotz SC, Clapham DE. Anion-sensitive fluorophore identifies the *Drosophila* swell-activated chloride channel in a genome-wide RNA interference screen. *PLoS One* 2012; 7(10):e46865.
- Strauß O, Müller C, Reichhart N, Tamm ER, Gomez NM. The role of bestrophin-1 in intracellular Ca²⁺ signaling. *Adv Exp Med Biol* 2014; 801:113-119.
- Strauß O, Neussert R, Müller C, Milenkovic VM. A potential cytosolic function of bestrophin-1. *Adv Exp Med Biol* 2012; 723:603-610.
- Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85(3):845-881.
- Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):4008-4013.
- Tjio JH, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med* 1958; 108(2):259-268.
- Tolmachova T, Anders R, Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM, Huxley C, Seabra MC. A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15(1):332-344.
- Tolmachova T, Ramalho JS, Anant JS, Schultz RA, Huxley CM, Seabra MC. Cloning, mapping and characterization of the human RAB27A gene. *Gene* 1999; 239(1):109-116.
- Tsunenari T, Nathans J, Yau KW. Ca²⁺-activated Cl⁻ current from human bestrophin-4 in excised membrane patches. *J Gen Physiol* 2006; 127(6):749-754.
- Tsunenari T, Sun H, Williams J, Cahill H, Smallwood P, Yau KW, Nathans J. Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels. *J Biol Chem* 2003; 278(42):41114-41125.
- Vaisey G, Miller AN, Long SB. Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the Bestrophin ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(47):E7399-E7408.
- Valastyan JS, Lindquist S. Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *Dis Model Mech* 2014; 7(1):9-14.
- Von Heijne G. Principles of membrane protein assembly and structure. *Prog Biophys Mol Biol* 1996; 66(2):113-139.
- Wagner A. Interaktion von Rab27a mit dem CaV1.3 L-Typ Ca²⁺-Kanal und mit Bestrophin-1. *Unv. Diss., Universität Regensburg* 2014.
- Wang H, Zhao Y, Zhang C, Li M, Jianq C, Li Y. Rab27a was identified as a prognostic biomarker by mRNA profiling, correlated with malignant progression and subtype preference in gliomas. *PLoS One* 2014; 9(2):e89782.

- Wang JS, Wang FB, Zhang QG, Shen ZZ, Shao ZM. Enhanced expression of Rab27a gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II. *Mol Cancer Res* 2008; 6(3):372-382.
- Wang Q, Ni Q, Wang X, Zhu H, Wang Z, Huang J. High expression of RAB27a and TP53 in pancreatic cancer predicts poor survival. *Med Oncol* 2015; 32(1):372.
- White K, Marquardt A, Weber BH. VMD2 mutations in vitelliform macular dystrophy (Best disease) and other maculopathies. *Hum Mutat* 2000; 15(4):301-308.
- Wistow G, Bernstein SL, Wyatt MK, Fariss RN, Behal A, Touchman JW, Bouffard G, Smith D, Peterson K. Expressed sequence tag analysis of human RPE/choroid for the NEIBank Project: over 6000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants. *Mol Vis* 2002; 8:205-220.
- Xiao Q, Prussia A, Yu K, Cui YY, Hartzell HC. Regulation of bestrophin Cl channels by calcium: role of the C terminus. *J Gen Physiol* 2008; 132(6):681-692.
- Xiao Q, Yu K, Cui YY, Hartzell HC. Dysregulation of human bestrophin-1 by ceramide-induced dephosphorylation. *J Physiol* 2009; 587(Pt 18):4379-4391.
- Yang T, Liu Q, Kloss B, Bruni R, Kalathur RC, Guo Y, Kloppmann E, Rost B, Colecraft HM, Hendrickson WA. Structure and selectivity in bestrophin ion channels. *Science* 2014; 346(6207):355-359.
- Yang YD, Cho H, Koo JK, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008; 455(7217):1210-1215.
- Yokoyama K, Kaji H, He J, Tanaka C, Hazama R, Kamigaki T, Ku Y, Tohyama K, Tohyama Y. Rab27a negatively regulates phagocytosis by prolongation of the actin-coating stage around phagosomes. *J Biol Chem* 2011; 286(7):5375-5382.
- Yu K, Cui Y, Hartzell HC. The bestrophin mutation A243V, linked to adult-onset vitelliform macular dystrophy, impairs its chloride channel function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(11):4956-4961.
- Yu K, Qu Z, Cui Y, Hartzell HC. Chloride channel activity of bestrophin mutants associated with mild or late-onset macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(19):4694-4705.
- Yu K, Xiao Q, Cui G, Lee A, Hartzell HC. The best disease-linked Cl-channel hBest1 regulates CaV1 (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains. *J Neurosci* 2008; 28(22):5660-5670.
- Zhang Y, Stanton JB, Wu J, Yu K, Hartzell HC, Peachey NS, Marmorstein LY, Marmorstein AD. Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease. *Hum Mol Genet* 2010; 19(6):1108-1118.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Talitha Sophia Schorb, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Interaktionen zwischen Bestrophin-1 und der GTPase Rab27a: Effekte krankheitsbedingter Mutationen“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Curriculum Vitae

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

Publikationen

Reichhart N, Markowski M, Ishiyama S, Wagner A, Crespo-Garcia S, Schorb T, Ramalho JS, Milenkovic VM, Föckler R, Seabra MC, Strauß O. Rab27a GTPase modulates L-type Ca²⁺ channel function via interaction with the II-III linker of CaV1.3 subunit. Cellular Signalling. 07/2015; 27(11).

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Promotion tatkräftig oder auch emotional zur Seite standen, insbesondere:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Olaf Strauß für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu dürfen, für die zahlreichen Ideen, die hervorragende Betreuung und sein jederzeit offenes Ohr;

Dr. Vladimir Milenkovic für das Zur-Verfügung-Stellen von Plasmiden;

Dr. Nadine Reichhart für die Hilfe bei der Betreuung meiner Doktorarbeit und die vielen kompetenten Antworten;

Magdalena Cordes für die Einarbeitung, die gute Zusammenarbeit, Freundschaft und gute Nachbarschaft nicht nur im Büro;

Gabriele Fels für die Einweisung ins Labor, das Beantworten meiner zahlreichen Fragen und die netten Gespräche;

Susanne Keckeis für den intensiven Austausch besonders während des Schreibprozesses, aber auch zuvor, die gegenseitige Motivation und die Freundschaft;

Und nicht zuletzt meinem Partner, meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld und dafür, dass sie an mich geglaubt haben.