

Regulation der Oberflächenexpression von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen im RPE

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Magdalena Cordes (geb. Markowski)

aus Stettin

2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2013 bis August 2018 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß in der Experimentellen Ophthalmologie der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Olaf Strauß

2. Gutachter: Prof. Dr. Ursula Koch

Disputation am: 17.12.2018

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Olaf Strauß, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in der experimentellen Ophthalmologie zu beginnen. Du hattest stets ein offenes Ohr für Belange jeder Art. Der wissenschaftliche Austausch und auch die offenen Gespräche haben mir viel Zuversicht und Motivation gegeben.

Desweiteren möchte ich Frau Prof. Dr. Ursula Koch für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Dissertation danken.

Mein besonderer Dank geht im Weiteren an Frau Dr. Nadine Reichhart für den stets kompetenten Austausch auf wissenschaftlicher Ebene. Ich danke Dir für all Deine guten Ratschläge im Laboralltag und nicht zuletzt für Deine erfrischend pragmatische Art.

An dieser Stelle möchte ich auch Frau Dr. Rita Rosenthal aus der klinischen Physiologie am Campus Benjamin Franklin für die Möglichkeit danken, das konfokale Lasermikroskop ausgiebig und jederzeit nutzen zu dürfen.

Ich danke Dir, Gabi, für all die praktischen Ratschläge bei kleinen und großen Problemen des Laboralltags. Danke Dir für Deine tatkräftige Unterstützung beim Präparieren und Isolieren der primären Zellen. Die langen Präparationszeiten wären ohne die netten Gespräche mit Dir nur halb so schön gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken. Insbesondere danke ich Dir, Sergio, für Deine Freundschaft auch über den großen Ozean hinaus. Ich möchte auch Talitha und Susanne für die kollegiale Zusammenarbeit im Labor und besonders die angenehmen Mittagspausen danken. Auch während meiner Elternzeit habt Ihr mich immer auf dem Laufenden gehalten. Ich danke auch Dir, Christophe, für den wissenschaftlichen Austausch mit Paris und die netten Gespräche auch außerhalb des Labors.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Meinen Eltern: Ich danke Euch dafür, dass Ihr immer an mich glaubt. Ohne Eure Zuversicht, wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin. Meinem lieben Mann: Ich danke Dir, dass Du mich auf meinem Weg aus Düsseldorf begleitet hast. Vielen Dank, für Deinen bedingungslosen Rückhalt. Meiner kleinen Tochter, Kalina: Danke, dass Du da bist! Du bereicherst jeden Tag meines Lebens.

Zusammenfassung (Deutsche Version)

Das retinale Pigmentepithel (RPE) steht in direkter Interaktion mit Photorezeptoren. Die Ursache vieler degenerativer Erkrankungen des Auges ist daher mit einer Fehlfunktion vom RPE verbunden. Sekretorische Prozesse vieler Zelltypen werden über das Zusammenspiel spannungsabhängiger Kalzium- (Ca^{2+} -) Kanäle und Rab- (*Ras-related in brain*) Proteinen, reguliert. Im RPE wird die Sekretion von Wachstumsfaktoren zur basolateralen Seite der Gefäßschicht über die Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen vom Subtyp $\text{Ca}_v1.3$ sowie unter anderem von der GTPase, Rab27a, reguliert. Heterolog exprimierte $\text{Ca}_v1.3/\beta_3/\alpha_2\delta_1$ -Kanäle zeigten bei Koexpression mit Rab27a eine negative Spannungsabhängigkeit und eine um 70 % reduzierte Stromdichte. Die Oberflächenexpression von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen war bei Koexpression mit Rab27a nur um 10 % reduziert. Die Überexpression von Rab27a in einer humanen RPE-Zelllinie resultierte in einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu positiven Membranpotenzialen, einer Reduktion der Stromdichte endogener $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle sowie einer verminderten Sekretion von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). Die Daten zeigen erstmals die direkte Modulation der Ca^{2+} -Kanalaktivität durch Rab27a.

Kennzeichnend für die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD), eine vererbte autosomal-dominante Form der Makuladegeneration, ist der reduzierte Hellanstieg (LP) im Elektrokulogramm (EOG) von betroffenen Patienten. BVMD ist mit Mutationen im *BEST1*-Gen assoziiert. Das Genprodukt von *BEST1*, Bestrophin-1 (Best-1), ist ein integrales Protein der basolateralen Membran im RPE. Sowohl im EOG von Patienten nach Inhibierung von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen durch Dihydropyridin als auch im Elektoretinogramm im murinen $\text{Ca}_v1.3$ -defizienten Modell ist ein reduzierter LP beschrieben worden. Die Hypothese, dass die Interaktion von Best-1 und $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen von funktioneller Bedeutung für das RPE ist, und der schädigende Effekt von Mutationen im *BEST1* durch die gestörte Interaktion des $\text{Ca}_v1.3$ -Kanals und Best-1 entsteht, liegt somit nahe. Es wurden vier krankheitsassoziierte *Missense*-Mutationen im *BEST1*-Gen (R218C, T6P, F80L und F305S) untersucht. Alle Mutanten zeigten eine Interaktion mit dem $\text{Ca}_v1.3/\beta_4/\alpha_2\delta$ -Kanalkomplex, obgleich die Effizienz in der Co-IP niedriger war als beim wildtypischen (WT) Best-1. Im heterologen Expressionssystem war die Stromdichte von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen in Anwesenheit der Mutanten reduziert und die Spannungsabhängigkeit in Anwesenheit von F80L und F305S verändert. Die verminderte Stromdichte korrelierte mit einer reduzierten Proteinlokalisierung in der Plasmamembran, sowohl von mutanten Best-1 also auch von $\text{Ca}_v1.3$. In primären Schweine RPE-Zellen war mutantes Best-1 delokalisiert, was gleichzeitig in der Fehllokalisierung von $\text{Ca}_v1.3$ und endogenem Best-1 resultierte. Zusätzlich waren T6P und F305S überwiegend apikal assoziiert. Die Ergebnisse konnten zusätzlich in humanen - aus induziert pluripotenten

Stammzellen abgeleiteten - RPE-Zellen bestätigt werden. Die reduzierte Lokalisation von $Ca_v1.3$ -Kanälen in der Plasmamembran könnte in einer verminderten Membranleitfähigkeit für Ca^{2+} resultieren, die wiederum die sekretorische Aktivität vom RPE und die circadiane Regulation der Phagozytose modulieren könnte. Dies würde teilweise den reduzierten LP im EOG von BVMD-Patienten erklären.

Zusammenfassung (Englische Version)

The retinal pigment epithelium (RPE) closely interacts with photoreceptors. Many degenerative retinal diseases are caused by a dysfunction of the RPE. Secretory processes in general are regulated by an interplay of voltage-dependent calcium (Ca^{2+}) channels and Rab *Ras-related in brain* proteins. In the RPE, regulation of growth factor secretion to the basolateral (choroidal) side requires the activation of L-type Ca^{2+} channels of the subtype $\text{Ca}_v1.3$, and among others Rab27a. Physical binding of heterologously expressed Rab27a to $\text{Ca}_v1.3$ channels was shown by co-immunoprecipitation (co-ip). Heterologously expressed $\text{Ca}_v1.3/\beta_3/\alpha_2\delta_1$ channels showed a shifted voltage-dependence and decreased current density of $\text{Ca}_v1.3$ channels about 70 % when co-expressed with Rab27a. However, co-localization analysis revealed that Rab27a co-expression reduced the surface expression of $\text{Ca}_v1.3$ only about 10 %. Rab27a over-expression in a human RPE cell line positively shifted the voltage dependence, decreased current density of endogenous $\text{Ca}_v1.3$ channels and reduced VEGF (vascular endothelial growth factor) secretion. These results show the first evidence for the direct modulation of $\text{Ca}_v1.3$ channels by Rab27a.

The hallmark of best vitelliform macular dystrophy (BVMD), an inherited autosomal dominant form of macular degeneration, is the reduction of the light-peak (LP) in the electro-oculogram (EOG) in patients. BVMD is associated with mutations in *BEST1* gene. The product, best-1, is an integral protein of the basolateral membrane in the RPE. Inhibition of $\text{Ca}_v1.3$ channels by dihydropyridines in patient's EOG and $\text{Ca}_v1.3$ -knockout mice showed a reduction of the LP in the electroretinogram. Thus, we propose that the best-1/ $\text{Ca}_v1.3$ channel interaction is of functional relevance for the RPE and the detrimental effect of mutations in *BEST1* is due to disturbed interaction between the Ca^{2+} channel and best-1. Four missense mutants of best-1 associated with BVMD were analyzed (R218C, T6P, F80L und F305S). All mutants showed interaction with the $\text{Ca}_v1.3/\beta_4/\alpha_2\delta_1$ channel complex although the co-ip efficiency was lower than that of the wildtype (wt) best-1. In heterologous expression, mutant best-1 reduced the current density of $\text{Ca}_v1.3$ channels and in some cases (F80L and F305S) altered voltage-dependence. Reduced current densities correlated with a reduced plasma membrane localization of both mutant best-1 and $\text{Ca}_v1.3$. In primary porcine RPE cells, mutant best-1 showed misplacement itself and affected both the surface expression of $\text{Ca}_v1.3$ and endogenous best-1. Additionally T6P and F305S displayed a pronounced appearance at the apical side. These results were confirmed for R218C and T6P in human induced pluripotent stem cell derived RPE cells. The reduced amount of $\text{Ca}_v1.3$ channels in the plasma membrane could result in decreased membrane conductance for Ca^{2+} and change the secretory activity of the RPE, the circadian regulation of phagocytosis and partly explain the reduced LP in the EOG of patients suffering from BVMD.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	5
Zusammenfassung (Deutsche Version)	6
Zusammenfassung (Englische Version)	8
Inhaltsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	14
1.1. Das Auge: Der Weg des Lichts	14
1.2. Das retinale Pigmentepithel	15
1.3. Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD)	18
1.3.1. Best-1: Ca ²⁺ -abhängiger Cl ⁻ -Kanal im RPE	19
1.3.2. Die Struktur von Best-1	20
1.4. Die Bedeutung von Ca ²⁺ im RPE	23
1.5. Rab27a und Cav1.3-Kanäle	24
1.6. Hypothese	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Methoden	27
2.1.1. Zellkultur	27
2.1.1.1. Immortalisierte Zelllinien	27
2.1.1.2. Primäre RPE-Zellen: Etablierung der Isolation, Transfektion und Immunzytochemie	27
2.1.1.3. Humane RPE-Zellen aus induziert pluripotenten Stammzellen	28
2.1.2. Molekularbiologische Methoden	29
2.1.2.1. Plasmid-Konstrukte	29
2.1.2.2. Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i>	29
2.1.2.3. Isolation von Plasmid-DNA	29
2.1.2.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Agarose-Gelelektrophorese	30
2.1.2.5. Mikroinjektion von Plasmid-DNA	30
2.1.2.6. Transfektion mittels Lipofektion	31
2.1.2.7. RT qPCR an primären RPE-Zellen	32
2.1.3. Immunzytochemische Antikörperfärbungen	33
2.1.3.1. Korrelationsanalyse nach <i>Pearson</i>	34
2.1.3.2. Pixelanalyse über <i>edge detection</i>	34
2.1.3.3. Apikal-basolaterale Orientierung in polarisierten RPE-Zellen	35
2.1.4. Koimmunpräzipitationen (Co-IPs)	35
2.1.4.1. Zellyse, Western Blot und SDS-Gelelektrophorese	35
2.1.4.2. Quantifizierung der Co-IP-Effizienz	37
2.1.5. Messung der VEGF-Sekretion mittels ELISA	37
2.1.6. Elektrophysiologische Messungen an L-Typ-Cav1.3-Kanälen	37

2.1.7. Statistische Auswertung	39
2.2. Material	40
3. Ergebnisse	48
3.1. Der Einfluss von Rab27a auf L-Typ-Ca _v 1.3-Kanäle	48
3.1.1. Modulation von Ca _v 1.3-Strömen durch Rab27a in CHO-K1-Zellen	48
3.1.2. Reduktion der Oberflächenexpression von Ca _v 1.3-Kanälen durch Rab27a	50
3.1.3. Reduktion von Ca _v 1.3-Kanalströmen bei Überexpression von Rab27a	51
3.1.4. Physikalische Interaktion von Rab27a und Ca _v 1.3	53
3.1.5. Reduktion der VEGF-Sekretion bei Überexpression von Rab27a	54
3.2. Regulation von L-Typ-Ca _v 1.3-Kanälen durch Best-1	55
3.2.1. Physikalische Interaktion von Ca _v 1.3-Kanälen mit <i>h</i> Best-1-Mutanten	55
3.2.2. Reduktion der Stromdichte und Modulation der Stromspannungsabhängigkeit	59
3.2.3. Reduzierte Oberflächenexpression von heterolog exprimierten Ca _v 1.3-Kanälen	63
3.2.4. Dominant-negativer Effekt von mutantern <i>h</i> Best-1	65
3.2.5. Delokalisation von T6P, F80L und F305S im Zytoplasma polarisierter RPE-Zellen	67
3.2.6. Apikale Lokalisation von T6P und F305S	70
3.2.7. Reduzierte Oberflächenexpression von Ca _v 1.3 in polarisierten RPE-Zellen	70
3.2.8. Delokalisation von Ca _v 1.3 und T6P in humanen RPE-Zellen	75
4. Diskussion	79
4.1 Regulation von L-Typ-Ca _v 1.3-Kanälen über Rab27a	79
4.1.1. Heterologes Expressionssystem versus endogener Expression von Ca _v 1.3-Kanälen	79
4.1.2. Oberflächenexpression von Ca _v 1.3 in Anwesenheit von Rab27a	80
4.1.3. Modulation der Ca _v 1.3-Kanalfunktion und VEGF-Sekretion durch Rab27a	81
4.2. Der Einfluss von mutantern <i>h</i> Best-1 auf L-Typ-Ca _v 1.3-Kanäle	83
4.2.1. Co-IP-Effizienz	84
4.2.2. Korrelation von reduzierter Stromdichte und Oberflächenexpression	85
4.2.3. Regulation der Oberflächenexpression von Ca _v 1.3-Kanälen	86
4.2.4. Dominant negativer Effekt von mutantern <i>h</i> Best-1	88
4.3. Fazit und Ausblick	89
Literaturverzeichnis	91
Anhang	99
Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Publikationsliste	101

Abkürzungsverzeichnis

ARPE-19	Humane retinal epitheliale Zelllinie, engl.: <i>human retinal pigment epithelial cell line</i>
<i>BEST1</i>	Gen, das für Bestrophin-1 kodiert
Best-1	Genprodukt von <i>BEST1</i> , engl.: <i>best-1</i>
(b)FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor, engl.: <i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Rinderalbuminserum, engl.: <i>bovine serum albumin</i>
BVMD	Best'sche vitelliforme Makuladystrophie, engl.: <i>best vitelliform macular dystrophy</i>
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>(complementary) deoxyribonucleic acid</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CHO-K1	Zelllinie aus Ovarienzellen des chinesischen Hamster, engl.: <i>chinese hamster ovary cells</i>
Co-IP	Koimmunpräzipitation, engl.: <i>co-immunoprecipitation (co-ip)</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>EcoRI</i>	Restriktionsenzym, Nuklease I aus dem Stamm R von <i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
(E)GFP	(verstärktes) grün fluoreszierendes Protein, engl.: <i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren, engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
EOG	Elektrookulogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum

GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
<i>h</i>	menschlich, engl.: <i>human</i>
HEK293	menschliche embryonale Nierenzelllinie, engl.: <i>human embryonic kidney cell line</i>
His	Polyhistidin
HRP	Meerrettichperoxidase, engl.: <i>horseradish peroxidase</i>
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor, engl.: <i>insulin-like growth factor</i>
IP	Immunpräzipitation
iPSCs	induziert pluripotente Stammzellen, engl.: <i>induced pluripotent stem cells</i>
L	Lysat
LP	Hellanstieg im EOG/ERG, engl.: <i>light peak</i>
LSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, engl.: <i>laser scanning microscope</i>
L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal	langsam inaktivierender Kalziumkanal, engl.: <i>longlasting calcium channel</i>
MDCK	Madin-Darby Hunde Nierenzellen, engl.: <i>madin-darby canine kidney cells</i>
(<i>m</i>)RNA	(Boten-) Ribonukleinsäure, engl.: (<i>messenger</i>) <i>ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
<i>n</i>	Anzahl
NB	nicht gebunden
P/S	Penizillin/Streptomycin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit Tween20
PCC	Korrelationskoeffizient nach Pearson, engl.: <i>Pearsons Correlation Coefficient</i>
PEDF	Pigmentepithelialer Faktor, engl.: <i>pigment epithelium-derived factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
POS	Außensegmente der Photorezeptoren, engl.: <i>outersegments of photoreceptors</i>

PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rab	<i>Ras (rat sarcoma)-related in brain</i>
REP-1	<i>Rab Escort Protein 1</i>
RFP	konservierte Aminosäuresequenz aus Arginin (R), Phenylalanin (P) und Prolin (P) am N-Terminus im Best-1
RIM1/2	Rab-interagierende Moleküle, engl.: <i>Rab-interacting molecules</i> (1 und 2)
ROI	Region von Interesse, engl.: <i>region of interest</i>
RPE	retinales Pigmentepithel, engl.: <i>retinal pigment epithelium</i>
RFP-Motiv	konservierte Aminosäuresequenz aus Arginin (R), Phenylalanin (F) und Prolin (P)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, engl.: <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
SD	Standardabweichung, engl.: <i>standard deviation</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat, engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Standardfehler, engl.: <i>standard error of the mean</i>
SOCE	Ca ²⁺ -Einstrom aus intrazellulären Ca ²⁺ -Speichern, engl.: <i>store-operated calcium entry</i>
ss	Schwein, lat.: <i>sus scrofa</i>
STIM1	stromales Interaktionsmolekül 1, engl.: <i>stromal interaction molecule 1</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl.: <i>Tris-buffered saline</i>
TMD	Transmembrandomäne(n)
VDCCs	Spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle, engl.: <i>voltage dependant Ca²⁺ channels</i>
VEGF	vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor, engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp, wildtypisch

1. Einleitung

1.1. Das Auge: Der Weg des Lichts

Trifft Licht auf das Auge, wird es zunächst von der Hornhaut sowie der Linse gebündelt und auf die neuronale Netzhaut (Retina) projiziert (Abbildung 1). Das Licht gelangt über die Gliazellen der Retina, sogenannte Müllerzellen, aus der vorderen Retina zu den Lichtsinneszellen (Photorezeptoren) der hinteren Retina. Im Wirbeltierauge spricht man von einer inversen Retina, da die visuelle Information erst in der hinteren Retina von den Photorezeptoren in einer Kaskade aus chemischen und elektrischen Signalen prozessiert wird. Von dort wird das Signal an retinale Neurone (Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen) und weiter an Ganglienzellen geleitet. Über den Sehnerv gelangt die visuelle Information ins Gehirn.

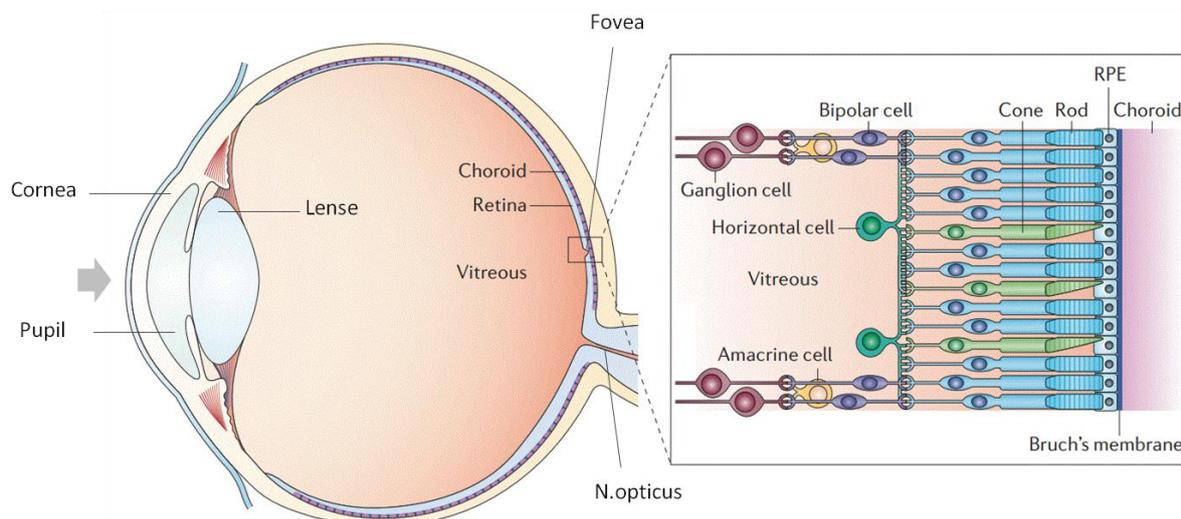


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines menschlichen Auges. Licht trifft auf durch die Hornhaut (engl.: *cornea*) und gelangt über die Pupille durch die Linse (engl.: *lense*) und den Glaskörper (engl.: *vitrous*) bevor es die lichtempfindlichen Photorezeptoren der Netzhaut (engl.: *retina*) (engl.: *cones*: Zapfen, engl.: *rods*: Stäbchen) erreicht. Der Kasten zeigt die Vergrößerung der Fovea: das retinale Pigmentepithel (RPE), die Gefäßschicht (Chorioid), die Bruch'sche Membran (*Bruch's membrane*). Licht wird zuerst vom hinteren Teil der Retina (Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen), weiter an Ganglionzellen der vorderen Retina geleitet (invertierte Retina). Von dort gelangt die visuelle Information über den Sehnerv (*nervus opticus*) ans Gehirn; Abbildung geändert nach Zhang (2012) [1].

Der Zellkörper der Photorezeptoren wird von Stäbchen oder Zapfen gebildet und in drei Abschnitte eingeteilt. Das Außensegment enthält lichtsensitives Photopigment und besteht aus dicht gepackten Stapeln von membranösen Scheiben (*disks*). Das Innensegment enthält Organellen sowie den synaptischen Terminus, der mit bipolaren Neuronen der Retina in Verbindung steht [2]. In den Photorezeptoren wird Lichtenergie über 11-*cis-Retinal* im Pigment von Rhodopsin absorbiert [3]. Durch die Lichtabsorption kommt es zu einer

Konformationsänderung vom 11-cis zum *All-trans-Isomer*. Da Photorezeptoren nicht re-isomerisieren können, wird das all-trans *Retinal* zum retinalen Pigmentepithel (RPE) transportiert, wo es wieder zum 11-cis-*Isomer* re-isomerisiert wird [4]. Nachdem es wieder bei den Photorezeptoren angekommen ist, dient *Retinal* zur Regeneration von Rhodopsin [4] [1]. Der Prozess des Sehens erfordert demnach zwei Arten von Zellen, die im Tierreich - von Insekten zu höheren Vertebraten – im Auge vorkommen: die licht-sensitive Photorezeptorzelle und die RPE-Zelle [5].

1.2. Das retinale Pigmentepithel

Das RPE liegt zwischen den lichtsensitiven Photorezeptoren und fenestrierten Kapillaren der Gefäßschicht (*Chorioidea*) [3, 6, 7]. RPE-Zellen enthalten Pigmentgranula und Organellen, die POS in Phagosomen abbauen (Abbildung 2). Die Photorezeptorschicht und das RPE stehen in direkter Interaktion miteinander. Die direkte Abhängigkeit voneinander entsteht schon bei der funktionellen Differenzierung während der Embryonalentwicklung des Auges [8]. Studien zu vererbaren retinalen Degenerationserkrankungen belegen eine starke Abhängigkeit vom RPE zu Photorezeptoren und andersrum [5]. Zum einen können Mutationen in Genen, die in Photorezeptorzellen exprimiert werden zu Erkrankungen führen, die primär das RPE betreffen und sekundär in einem Verlust von Photorezeptoren resultieren [5]. Zum anderen können auch Mutationen in Genen, die im RPE exprimiert werden primär die Degeneration von Photorezeptoren zur Folge haben [5]. Die Eigenschaft von Photorezeptoren, Licht zu detektieren, hängt demnach von ihrer Interaktion mit dem RPE ab.

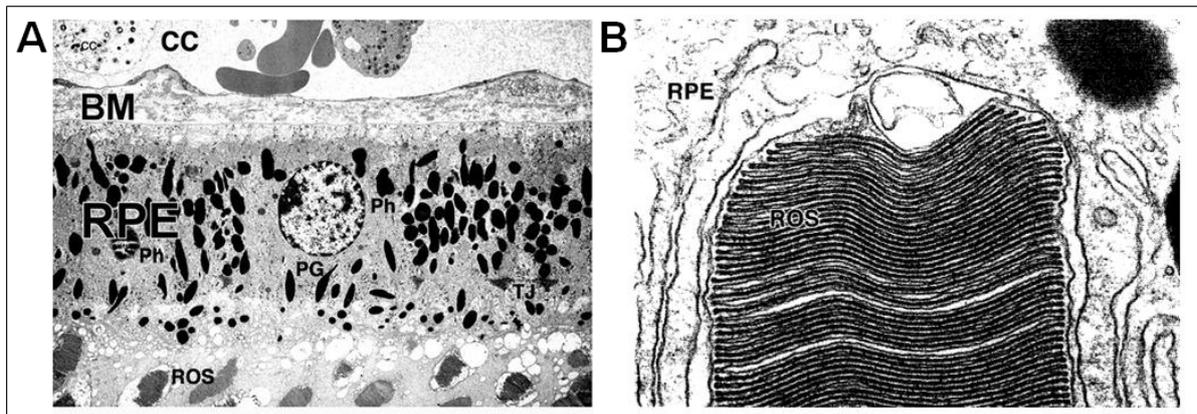


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines gesunden menschlichen Auges verdeutlichen den engen Kontakt zwischen dem retinalen Pigmentepithel (RPE) und den Rezeptorausensegmenten (ROS) von Photorezeptoren. A: das RPE grenzt apikal an ROS und basolateral über die Bruch'sche Membran (BM) an die Gefäßschicht (Choriocapillaris, CC). Die RPE Zellen sind über *Tight Junctions* (TJ) miteinander verbunden und enthalten pigmentierte Granula (PG) und Organellen, die ROS in Phagosomen (Ph) abbauen, **Abbildung geändert nach Strauß (2005) [5]; B:** ROS werden von einer RPE-Zelle umschlossen. (Abbildung A modifiziert nach Strauß 2005 [5], **Abbildung B geändert nach Saari (2000) [9].**

Das RPE bildet eine Einzelschicht aus hexagonalen, kubischen, sekretorischen Epithelzellen, die die innere Wand des Augapfels auskleiden [3]. Das RPE verfügt über lange apikale Mikrovilli, die die POS umgeben [7]. Die Polarität von RPE-Zellen ist die Voraussetzung für den transepithelialen Transport. Basolateral wird das RPE über die Bruch'sche Membran mit der *Chorioidea* verbunden. Dabei handelt es sich um eine mehrschichtige Struktur der Extrazellulärmatrix [10], die den Austausch von Nährstoffen und Signalmolekülen zwischen RPE und Blut sowie zwischen RPE und chorioidalen Endothelzellen gewährleistet. Das RPE erfüllt zahlreiche Funktionen (Abbildung 3), sodass bereits die Störung einer einzelnen Funktion die Entstehung von degenerativen Erkrankungen im Auge begünstigt [5].

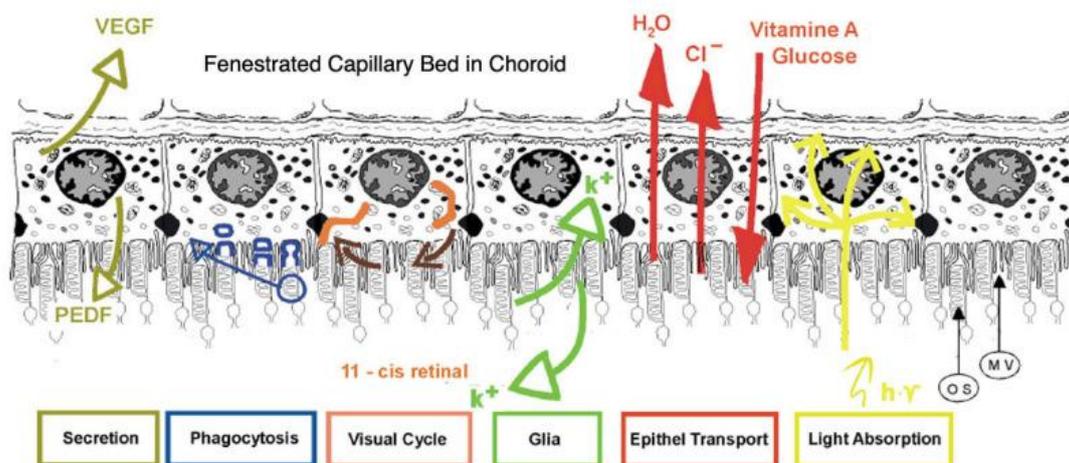


Abbildung 3. Funktionen des retinalen Pigmentepithels (RPE). MV = apikale *Mikrovilli*; OS = Außensegmente der Photorezeptoren; PEDF = *pigment epithelium-derived factor*; VEGF = *vascular endothelial growth factor*. (Abbildung aus Strauß (2005) [5])

Zwischen den POS und dem RPE befindet sich die Interphotorezeptormatrix, die im differenzierten Auge den Austausch von Nährstoffen, Signalmolekülen und Stoffwechselprodukten zwischen RPE und Photorezeptoren vermittelt [10, 11]. Das RPE bildet über *Tight-Junction*-Proteine die Blut-Retina-Schranke [12], über die der Austausch von Nährstoffen (Glukose oder Vitamin A), Ionen, Wasser, Gasen sowie Abfallprodukten zwischen Photorezeptoren und angrenzenden Blutgefäßen kontrolliert wird [13]. Der Transport von Wasser aus dem subretinalen Raum, das durch intraokulären Druck aus dem Metabolismus von Photorezeptoren und Glaskörper entsteht [14], wird hauptsächlich durch den transepithelialen Transport von Chlorid (Cl^-) aus dem subretinalen Raum ins Blut bestimmt [14, 15]. Zusätzlich kann das RPE immunmodulierende Faktoren wie Interleukin-8 oder den Komplementfaktor H sezernieren [15]. Durch die Expression von entsprechenden Rezeptoren (wie beispielsweise den Rezeptor des Haupthistokompatibilitätskomplexes oder den Tumornekrosefaktor, $TNF-\alpha$) kann das RPE auf verschiedene Faktoren der

Immunkaskade reagieren [5]. Durch die Sekretion von zahlreichen Wachstumsfaktoren erfüllt das RPE zusätzlich wichtige sekretorische Funktion im Auge. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der pigmentepitheliale Faktor (PEDF), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) oder der insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF-1). Wenn die sekretorische Funktion vom RPE gestört ist, kommt es zu proliferativen Erkrankungen, wie der chorioidalen Neuvaskularisation [5]. Unter anderem wird VEGF an der basolateralen Seite vom RPE sezerniert. Dort induziert VEGF die Proliferation und Migration von vaskulären Endothelzellen und ist für die fenestrierte Struktur des Chorioidendotheliums verantwortlich [16]. VEGF ist von essentieller Bedeutung sowohl für die physiologische als auch pathophysiologische Angiogenese. PEDF wird als neurotrophischer Faktor zur apikalen Seite vom RPE freigesetzt, um die neuronale Retina vor Apoptose zu schützen [17-19]. Über den hohen Gehalt an Melanin in zytoplasmatischen Granula (Melanosomen) (Abbildung 4) absorbieren RPE-Zellen Licht, das über die Linse auf der Makula gebündelt wird [6].

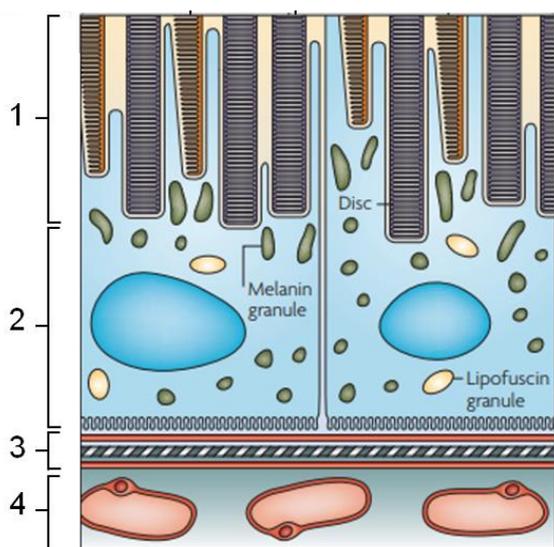


Abbildung 4. Schematische Darstellung des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der Bruch'schen Membran. Die Photorezeptoraußensegmente (1) werden von apikalen Mikrovilli der RPE-Zellen, die zahlreiche Melanin- und im Alter Lipofuszin-Granula (lipofuscin granules) (2) enthalten, umgeben. Die Bruch'sche Membran (3) grenzt apikal an das RPE an und besteht aus der Plasmamembran vom RPE, einer inneren Kollagenschicht, einer Elastinschicht, einer äußeren Kollagenschicht sowie der Plasmamembran der Gefäßschicht (Chorioidea, 4); Abbildung geändert nach Wright (2010) [20].

Gleichzeitig sind RPE-Zellen an der Regeneration des visuellen Pigments sowie an der täglichen Phagozytose von POS beteiligt [15]. Ähnlich wie Makrophagen verfügen RPE-Zellen über eine hohe postmitotische Phagozytoseaktivität [21]. Die Phagozytose der POS erfolgt über die basolaterale Membran vom RPE. Lichtsensitive POS unterliegen konstanten Recyclingsprozessen. Täglich werden 10 % der POS durch RPE-Zellen phagozytiert. Bei der altersbedingten Makuladegeneration kommt es zur Ansammlung von nicht weiter verwertbaren und abbaubaren Abfallprodukten, die in Form von oxidierten Proteinen und Lipiden als Lipofuszingranula in der Makula aggregieren. Die Akkumulation von Lipofuszin in der Makula kann die Funktion und die Viabilität vom RPE beeinträchtigen und zum Zelltod von RPE-Zellen führen. Die fortschreitende Degeneration vom RPE hat das Absterben von Photorezeptoren zur Folge, was schließlich zum vollständigen Sehverlust führt. Die

vermehrte Ansammlung von Lipofuszin im Bereich der Makula ist außerdem charakteristisch für eine seltene Form der vererbten Makuladegeneration, die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD).

1.3. Best'sche vitelliforme Makuladystrophie

Bei der BVMD kann es bereits in frühen Lebensjahren zu einer vermehrten Ablagerung von Lipofuszin in der Fovea kommen. Die Fovea ist eine Einsenkung der Retina und liegt im zentralen Bereich der Makula (Abbildung 5). Die Fovea besteht aus ausschließlich aus Zapfen, die das scharfe Sehen und die Farbwahrnehmung ermöglichen [20]. Obwohl die Fovea nur einen kleinen Teil der Retina ausmacht, gelangen von dort 50% der gesamten visuellen Information an das Gehirn [1].

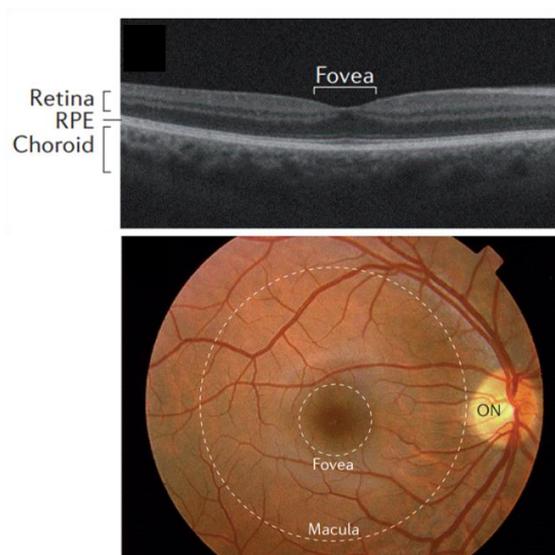


Abbildung 5. Oben: Retinale Anatomie im gesunden (A) Auge. Darstellung der Strukturen mittels optischer Kohärenztomografie. **Unten:** Funduskopische Aufnahme des Augenhintergrundes (Fundus) die Fovea (ca. 1,5mm Durchmesser), die Einsenkung der Retina im zentralen Bereich der Makula. Die Fovea enthält ausschließlich Zapfen und ist der Bereich des schärfsten Sehens. ON bezeichnet den Sehnerv, nervus opticus, über den visuelle Informationen an das Gehirn weitergeleitet werden; Abbildung geändert nach Zhang (2012).[1].

In histologischen Analysen bei BVMD-Patienten wurden Lipofuszinaggregate in Melanosomen nachgewiesen [21]. Im Verlauf der Erkrankung kann es zum Verlust des schärfsten Sehens kommen. Derzeit existieren keine Kausaltherapien für die Behandlung von retinalen Dysfunktionen, wie der BVMD und der altersabhängigen Makuladegeneration. Der molekulare Pathomechanismus dieser Erkrankung ist jedoch bis heute nicht verstanden. Es wird vermutet, dass ein Defekt im endozytotischen Recyclingprozess vom RPE die Ansammlung von Lipofuszin fördert [21, 22]. Der deutsche Ophthalmologe Friedrich Best hat die Symptomatik der BVMD erstmals 1905 bei acht Personen einer Familie beschrieben. Es handelt sich um eine Erkrankung, die autosomal-dominant vererbt wird. BVMD wird durch Mutationen im *BEST1*-Gen verursacht [23-26]. Unabhängige Studien bestätigen, dass das Genprodukt von *BEST1*, Bestrophin-1 (Best-1), im RPE exprimiert wird [24] [23]. Die genaue Prävalenz von BVMD ist unbekannt, da die Betroffenen sich nicht alle einer ärztlichen Untersuchung unterziehen oder die Symptome nicht vom Ophthalmologen als BVMD erkannt werden. Betroffen sind insbesondere Menschen in den ersten beiden Lebensdekaden. Es

sind aber auch spätere Manifestationen im höheren Lebensalter möglich, was die Diagnose oft erschwert. Ein weiteres Charakteristikum der BVMD ist die Visusminderung im Bereich des schärfsten Sehens. Außerdem zeigen sich in der Untersuchung des Augenhintergrundes eidotterartige (vitelliforme) Ablagerungen in der Makula, die beim Fortschreiten der Erkrankung in mehrere Stadien unterteilt werden [27]. Im ersten Stadium der Erkrankung sind vitelliforme Läsionen im Bereich der Makula zu sehen. Später kommt es zu mehrfachen gelblichen Ablagerungen im RPE, was als „Rührei-Stadium“ bezeichnet wird. In der Folge entsteht durch die degenerativen Prozesse Narbengewebe. Selten kann es zu Neovaskularisationen der *Chorioidea* kommen. Der vollständige Sehverlust kann die Folge sein. Die phänotypische Ausprägung und der zeitliche Verlauf der Erkrankung sind sehr heterogen [28]. Das Auftreten der ersten Symptome im juvenilen Alter, die charakteristische Veränderung des Augenhintergrundes (*Fundus*) und ein verminderter Hellanstieg (LP) im Elektrookulogramm (EOG) sind typische Symptome für die Diagnose von BVMD. Bei dieser Untersuchung wird die Ladungsdifferenz zwischen dem anterioren und dem posterioren Pol des Auges gemessen, die das Auge zu einem Dipol machen. Die Messbarkeit erfolgt durch eine Positionsänderung des Dipols. Das negative Potential auf der posterioren Seite des Auges entsteht durch Transport von negativ geladenen Chlorid- (Cl^-) Ionen durch das RPE. Dazu werden zwei Elektroden, eine temporal und eine nasal auf der Haut des Patienten angelegt und die Spannung zwischen beiden abgeleitet. Es wird vermutet, dass es bei Lichteinfall zur Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) kommt, das als hypothetische LP-Substanz an einen Rezeptor der apikalen Membran im RPE bindet. Das könnte die Aktivierung der Phospholipase C und folglich den Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} durch die Aktivierung von Inositoltrisphosphat-3-Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum (ER) auslösen. Das ER dient als intrazellulärer Speicher für Ca^{2+} in der Zelle. Es ist anzunehmen, dass der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle in der basolateralen Membran vom RPE aktiviert [29]. Die erhöhte Leitfähigkeit für Cl^- könnte die Depolarisation der basolateralen Membran vom RPE bewirken, wo Best-1 lokalisiert ist. Es wurde gezeigt, dass Best-1 am Ca^{2+} -Einstrom aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (SOCE) beteiligt ist, da es mit dem Ca^{2+} -Sensorprotein, dem stromalen Interaktionsmolekül (STIM1), im ER kolokalisiert [14]. STIM1 ist demnach essenziell für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase. Es besteht die Hypothese, dass Mutationen im *BEST1*-Gen an der Entstehung des LPs beteiligt sind, wobei unklar ist, warum es bei der BVMD zur Degeneration im zentralen Bereich der Makula kommt, da Best-1 überwiegend in den peripheren Bereichen der Retina nachgewiesen werden konnte [30].

1.3.1. Best-1: Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanal im RPE

Unabhängige Studien belegen, dass Best-1 ein transmembranes Protein ist, das in der basolateralen Membran im RPE exprimiert wird [31, 32]. Nachdem anfangs Best-1 nur als Cl^-

-Kanal beschrieben worden ist [29, 33], haben spätere Überexpressionsstudien den Einfluss von Best-1 auf die Kinetik und Spannungsabhängigkeit von endogen exprimierten L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen [34, 35] gezeigt. In transfizierten Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie, HEK293, wurde Best-1 als volumen-regulierter oder Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanal [36, 37] mit einer Durchlässigkeit für Hydrogencarbonat (HCO_3^-) beschrieben [29]. In humanen RPE-Zellen wurde Best-1 eine Anionenkanalfunktion zugesprochen [38]. Im Widerspruch dazu stehen jedoch andere Studien, die zeigen, dass das Einbringen (*Knockin*) oder das Entfernen (*Knockout*) des *BEST1*-Gens die Cl^- -Leitfähigkeit im RPE nicht beeinflusst aber zu einer Änderung im Ca^{2+} -Signalling führt [35, 39]. In Mäusen, die einen *Knockout* der porenformenden, $\text{Ca}_v1.3$, oder der Ca^{2+} -Kanaluntereinheit, β_4 , trugen, konnte ein verminderter LP im EOG nachgewiesen werden [39]. Es ist daher anzunehmen, dass der reduzierte LP bei BVMD-Patienten auf eine gestörte Interaktion von Best-1 und Ca^{2+} -Kanälen im RPE zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse bisheriger Studien konnten jedoch nicht eindeutig erklären, warum Mutationen von Best-1 zur Symptomatik der BVMD führen. Darüber hinaus existieren diesbezüglich sogar widersprüchliche Ergebnisse. Es existiert kein Modell für die Erkrankung, die durch Mutationen im *BEST1* verursacht wird. Viele Ergebnisse beruhen aus Studien im heterologen Expressionssystem. Im murinen Modell zeigte der *Knockout* von Best-1 respektive der *Knockin* von mutantern Best-1 unterschiedliche Phänotypen: Mäuse, denen Best-1 fehlt, zeigten größere LPs im EOG, während bei Ratten, die WT Best-1 überexprimierten, kein Anstieg in der LP-Amplitude messbar war [38]. Auch beim Patienten zeigt sich die BVMD als heterogenes Krankheitsbild, sodass der Pathomechanismus der dominant-vererbaren Erkrankung bis heute nicht vollständig verstanden ist. Da Best-1 die Ca^{2+} -Freisetzung aus den SERCA reguliert [35, 39], besteht die Hypothese, dass intrazelluläres Best-1 an der Freisetzung von Ca^{2+} im ER indirekt beteiligt sein könnte. Best-1 könnte Cl^- als Gegenion bei der Aufnahme von Ca^{2+} in zytosolische Speicher transportieren und umgekehrt [40, 41]. In HEK293-Zellen wurde gezeigt, dass höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen heterolog exprimiertes humanes Best-1 aktivieren [42].

1.3.2. Die Struktur von Best-1

BEST1 ist auf dem langen Arm (*q*) im Chromosom 11 an Position 12.3 (11q12.q13.1) lokalisiert [23]. Best-1 ist als integrales Membranprotein phylogenetisch konserviert und wurde erstmals in *Caenorhabditis elegans* identifiziert [43]. Homologe Sequenzen wurden im Tierreich, in Pilzen und Prokaryoten gefunden [43]. Bis heute sind 100 verschiedene Mutationen im *BEST1* beschrieben, die größtenteils (92 %) am N-Terminus des Best-1-Proteins lokalisiert sind [28]. Die Konservierung beschränkt sich hauptsächlich auf N-terminale Aminosäuren 350–400, sogenannte RFP-Motive (*arginine* (R), *phenylalanine* (F),

proline (P)) [43]. Es sind 8 transmembrane RFP-Domänen bekannt, die für Exone und konservierte Exon-Introngrenzen kodieren. Zur Gruppe der *humanen* Bestrophine (*hBest*) gehören neben *hBest-1*, noch *hBest-2*, -3 und -4 [33, 44]. *hBest-2* wird neben *hBest-1* auch im Auge exprimiert [45]. Im RPE wird ausschließlich *hBest-1* exprimiert [27], wobei es dort in der basolateralen Membran [32] sowie im ER [41, 46] lokalisiert ist. Neben der Expression im RPE wurde Boten-RNA (*mRNA*) von *BEST1* auch im Gehirn nachgewiesen, wo es an der Freisetzung der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat beteiligt ist [47]. Außerdem wurde *hBest-1* auch in der Plazenta und in Hoden gefunden [23, 24]. In der Maus konnte *BEST1-mRNA* im zentralen Nervensystem [48], in Spinalganglien [49] und in Spermien [50] nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht von *hBest-1* beträgt ungefähr 68 kDa [24]. Für *hBest-1* wurde ein Modell prognostiziert (Abbildung 6A), das Vorlage für die Auswahl der Best-1-Mutanten war [29, 31]. Neueste röntgenkristallographischen Strukturanalysen von prokaryotischem Best-1 aus *Klebsiella* und von Best-1 aus dem Huhn haben ähnliche Strukturen modelliert [51]. In allen drei Modellen sind vier Transmembrandomänen (TMD) beschrieben, wobei der C- sowie N-Terminus des Moleküls jeweils im Zytosol liegen, sofern Best-1 in die Plasmamembran eingebaut ist [47, 51, 52]. Außerdem ist den Modellen gemein, dass die TMD1 und TMD2 sowie TMD3 und TMD4 extrazellulär über kurze hydrophobe Aminosäuresequenzen miteinander verbunden sind, während intrazellulär eine größere Schleife die TMD2 und TMD3 verbindet (Abbildung 6 A-C). Das vereinfachte Strukturmodell nach röntgenkristallographischer Analyse von Hühner-Best-1 zeigt (Abbildung 7), dass der Ionenkanal aus jeweils fünf symmetrisch, um eine zentrale Achse angeordneten Monomeren von Best-1 gebildet wird [51, 52]. Die Permeabilität größerer Ionen wird durch hydrophobe Aminosäuren verhindert. Solche Permeabilitätsfilter befinden sich an den besonders schmalen Regionen der Ionenkanalpore, wie in der sogenannten Halsregion [47], die für das *Gating* entscheidend sein könnte. Die Bindestellen für Ca^{2+} (Ca^{2+} clasps, Abbildung 6 B) liegen innerhalb des großen Hohlraums zwischen den Engstellen im überwiegend zytoplasmatischen Abschnitt des Best-1-Moleküls (Abbildung 6 B). Durch die Bindung an Ca^{2+} -Bindestellen könnte die Konformationsänderung des Moleküls erfolgen. Die kristallographische Strukturanalyse wurde für den Ca^{2+} -gebundenen Zustand des Moleküls durchgeführt. Pro Ionenkanal gibt es mindestens 15 Bindestellen für Anionen [47, 51]. Sequenzanalysen haben eine Homologie von 74 % zwischen *hBest-1* und dem Hühner Best-1 ergeben [51].

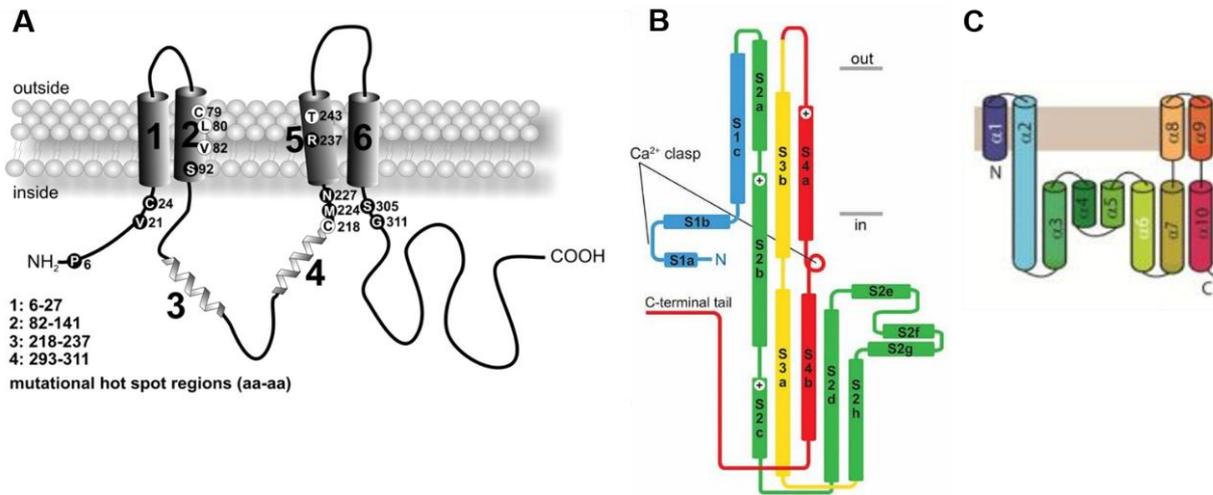


Abbildung 6: Topologische Modelle für Bestrophin-1 (Best-1) in verschiedenen Spezies. A: humanes Best-1 [31]; **B:** eukaryotisches Hühner Best-1 nach röntgenkristallographischer Strukturanalyse; **C:** prokaryotisches *Klebsiella* Best-1 nach röntgenkristallographischer Strukturanalyse (Abbildung aus Dickson (2014) [51]).

Nach dem Topologiemodell von Milenkovic (2007) (Abbildung 6 A) sind vier Mutations-*hotspots* im Best-1 (Abbildung 6 A) beschrieben [31], wobei jeweils eine aus jedem *hotspot* für die Experimente dieser Arbeit verwendet wurde (1: T6P, 2: F80L, 3: R218C und 4: F305S). Die Nomenklatur der Mutationen gibt die Aminosäure an, bei der ein Basenaustausch zur Translation einer anderen Aminosäure führt. F305S und R218C liegen laut des vorgeschlagenen Topologiemodells (Abbildung 6 A) intrazellulär im Bereich der letzten TMD am C-Terminus, während F80L transmembranständig ist und T6P am intrazellulären N-Terminus vorzufinden ist. Interessanterweise liegt T6P dem Modell vom Hühner-Best-1 zufolge in der Nähe einer Ca²⁺-Bindestelle (Abbildung 6 B).

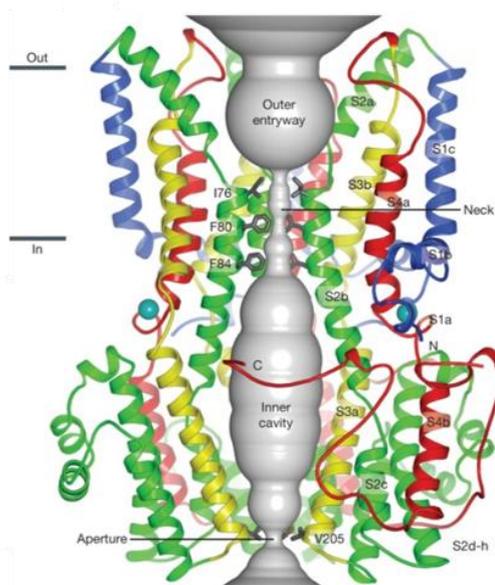


Abbildung 7: Ionenkanalpore von Hühner Bestrophin-1 (Best-1). Vereinfachte Darstellung röntgenkristallographischer Strukturanalyse zeigt drei von fünf Untereinheiten von Best-1 (die vorderen beiden sind entfernt); sekundäre Strukturelemente sind - entsprechend ihrer Einteilung in vier Segmente - farblich gekennzeichnet (S1: blau, S2: grün; S3: gelb, S4 und der C-Terminus: rot). (Abbildung geändert nach Dickson (2014) [51])

1.4. Die Bedeutung von Ca^{2+} im RPE

Die Forschung an Ionenkanälen im RPE ist die Grundlage für das Verständnis vieler degenerativer Erkrankungen der Retina. Das RPE exprimiert spannungs- und ligandenaktivierte Ca^{2+} -Kanäle, Cl^- , K^+ -Kanäle sowie Na^+ -Kanäle [5]. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle regulieren die sekretorische Aktivität, während ligandenaktivierte Kationenkanäle die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase beeinflussen oder als treibende Kraft beim Ionentransport fungieren [41]. Cl^- und K^+ -Kanäle sind an der Volumenregulation sowie dem transepithelialen Ionentransport beteiligt [5]. Das Zusammenspiel dieser Ionenkanäle bestimmt die physiologische Interaktion mit den Photorezeptoren. Änderungen der Ionenkanalaktivität oder Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle kodieren, sind die Ursache vieler degenerativer Prozesse in der Retina [41]. Der Anstieg von intrazellulärem freiem Ca^{2+} als Sekundärbotenstoff moduliert hauptsächlich die sekretorische Aktivität im RPE [41]. Das RPE exprimiert eine Vielzahl von verschiedenen Ionenkanälen oder Transportern, die einen Anstieg an intrazellulärem freiem Ca^{2+} bewirken [5]. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VDCCs) lassen sich abhängig von ihrer zeit- und spannungsabhängigen Aktivierung sowie Blockersensitivität in Untergruppen einteilen. Es gibt 4 Arten von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen ($\text{Ca}_V1.1-4$), die über die Gene ihrer porenformenden Untereinheit definiert werden [53]. Im Fokus dieser Arbeit stehen spannungsaktivierte L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanäle. Diese aktivieren bei negativem Membranpotential (-70 mV) und zeichnen sich durch eine langsame Inaktivierung aus (L-Typ, *longlasting*)[54]. $\text{Ca}_V1.3$ -Kanäle setzen sich aus einer porenformenden α_{1D} -Untereinheit, einer β -Untereinheit sowie einer $\alpha_2\delta$ -Untereinheit zusammen (Abbildung 8). α_2 und δ werden posttranslational über Disulfidbrücken verbunden und bilden zusammen die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit [53, 55]. Die Pore des $\text{Ca}_V1.3$ -Kanals, α_{1D} , reguliert die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften von VDCCs [56]. $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten regulieren den zellulären Transport der Kanalporen zur Plasmamembran und können so den Ca^{2+} -Kanalstrom erhöhen [57]. Zytosolische β -Untereinheiten von $\text{Ca}_V1.3$ -Kanälen sind von entscheidender Bedeutung für den zellulären Transport der α_{1D} -Untereinheit zur Plasmamembran und die Modulation von Ca^{2+} -Kanalströmen über die Bindung anderer Proteine und Signalmoleküle [58]. Mehrere Studien belegen, dass L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanäle bei der synaptischen Transmission durch innere Haarzellen [59, 60] und in Prozessen an Photorezeptorsynapsen beteiligt sind [61]. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Best-1 an β -Untereinheiten von $\text{Ca}_V1.3$ -Kanälen bindet und L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanalströme moduliert [62].

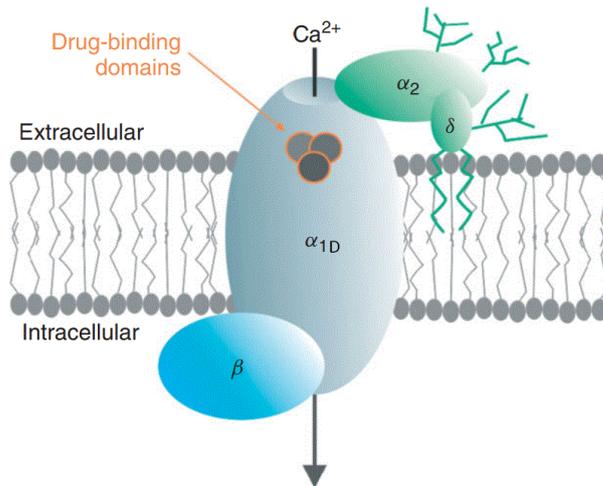


Abbildung 8: Struktur der Untereinheiten von spannungsabhängigen Ca_v1.3-Kanälen. Die α_{1D}-Untereinheit ist die porenformende Untereinheit, die über Ca²⁺-Kanal-Antagonisten, wie Dydidopyridin, inhibiert werden kann. Die β-Untereinheit ist intrazellulär, die α₂δ-Untereinheit extrazellulär an die transmembrane α_{1D}-Untereinheit gebunden. (Abbildung geändert nach Striessnig (2014) [56])

Ca_v1.3-Kanäle sind insbesondere wichtige Regulatoren der Insulinsekretion durch pankreatische β-Zellen [63], der Luteinisierungs- oder Wachstumshormone durch die Hypophyse, aber auch der Sekretion von VEGF durch das RPE [16, 64-66]. Im RPE werden L-Typ-Kanäle entweder über Tyrosinkinasen, wie die src-Kinase, oder durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie den FGF-2-Rezeptor, reguliert [5]. Die Signaltransduktion zahlreicher Transportvorgänge in der Zelle wird über GTP- (Guanosintriphosphat-) bindene Proteine, GTPasen, reguliert. GTPasen werden daher als „molekulare Schalter“ bezeichnet werden. Neben seiner Expression in einer Vielzahl von Zellen (sekretorischen Zellen, hämatopoetisches System, Lunge, Milz, Pankreas, Gastrointestinaltrakt [67]) wird die kleine GTPase, Rab27a, auch im RPE exprimiert [67, 68]. Rab27a gehört zu der Familie der Rab-Proteine (*Ras (rat sarcoma)-related in brain*). Für Subtypen von Rab-Proteinen und VDCCs wurde beschrieben, dass sie in direkter Interaktion mit Proteinen der Vesikelfusionsmaschinerie im exozytotischen Prozess stehen. Daher ist es möglich, dass Rab27a sekretorische und endozytotische Prozesse, die von VDCCs reguliert werden, beeinflusst.

1.5. Rab27a und Ca_v1.3-Kanäle

In der Familie der Rab-Proteine lassen sich über 60 Mitglieder in endozytotische und exozytotische Rab-Proteine einteilen. Die Aktivität von Rab-Proteinen wird über ihren GDP/GTP-Zyklus reguliert. Rab-Proteine werden über die Prenylierung posttranslational modifiziert und liegen entweder in einem aktiven, GTP-gebundenen oder in einem inaktiven, GDP (Guanosindiphosphat)-gebundenen Zustand vor. Die inaktive Form ist frei im Zytosol vorzufinden. Die aktive Form von Rab bindet an die zelluläre Membran und interagiert bei dem Transport von Vesikeln zur Zellmembran mit spezifischen Effektorproteinen [69]. Wenn Proteine nicht prenyliert werden, bleiben diese innerhalb des Zytosols und können ihre Funktion nicht ausführen [70]. Rab27a wird mit einer Erkrankung der Aderhaut, der

Chorioideremie, assoziiert. Durch die mutationsbedingte reduzierte Aktivität des *Rab Escort Proteins* (REP-1) kommt es zur verminderten Prenylierung von Rab27a. Der Funktionsverlust von Rab27a in der Retina resultiert in einem fortschreitenden Zerfall der Aderhaut, der Retina und vom RPE und führt schließlich zur Erblindung [71]. Rab27a reguliert über die Bindung an Lysosomen den lysosomalen Transport in der Zelle [72]. Im murinen adulten RPE wurde gezeigt, dass Rab27a - entsprechend seiner intrazellulären Funktionen - diffus zytosolisch verteilt ist, wobei es gleichzeitig im Bereich der basolateralen Plasmamembran teilweise mit der porenformenden Ca^{2+} -Kanal-Untereinheit, $\text{Ca}_v1.3$, kolokalisiert [73]. Rab11b unterstützt die Beseitigung von L-Typ- $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen aus der Plasmamembran und reguliert so die Anzahl von Ionenkanälen in der Plasmamembran [69]. Außerdem sind die Rab-interagierenden Moleküle 1 und 2 (RIM1/2) wichtig für die Ca^{2+} -abhängige Sekretion im RPE [74]. Sie interagieren mit Rab3 und stehen beide sowohl in physikalischer [75, 76] als auch funktioneller Interaktion mit β -Untereinheiten von VDCCs in verschiedenen Zelllinien [76, 77]. RIM verlangsamt unter anderem die zeitabhängige Inaktivierung von L-Typ-VDCCs über die Interaktion mit der β -Untereinheit im heterologen Expressionssystem [76, 77]. Bei Koexpression von RIM mit β_2 oder β_4 bleibt die Stromdichte unverändert, während die Koexpression mit der β_4 -Untereinheit zu einer höheren Stromdichte führt [76]. Die Analyse im Rab3a-defizienten murinen Modell zeigte, dass Rab3a und die Interaktionspartner späte Stadien von synaptischer Fusion und die Rekrutierung von Vesikeln kontrollieren [78, 79]. Rab27a ist in sekretorischen Vesikeln zahlreicher Zelltypen vorhanden [67, 80]. Sowohl in Zelllinien [81-83] als auch in Mausmodellen [81, 84] koordiniert Rab27a die Rekrutierung und das Andocken von Insulinvesikeln zur Plasmamembran pankreatischer β -Zellen und könnte zukünftig bei der Therapie von *Diabetes mellitus* Typ II von Bedeutung sein [85]. Das Fehlen von Rab27a hat schwerwiegende Störungen in der Fusion von Vesikeln im sekretorischen Prozess und somit in der Immunabwehr zur Folge. Dies ist abhängig von der Funktionalität sekretorischer Prozesse in zytotoxischen T-Lymphozyten [68]. Es wurde gezeigt, dass exozytotische Regulatorproteine, Munc13-14, und Rab27a einen Komplex bilden, der sekretorische Lysosomen zur Plasmamembran in Mastzellen transportiert und so den Zelltod zielgerichtet reguliert [86]. Neben Rab3 ist auch Rab27a an Sekretionsprozessen im RPE beteiligt [78]. Sekretorische Prozesse in vielen Zelltypen erfordern die Aktivierung sowohl von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle und als auch von Rab27a. Die direkte Modulation der funktionellen Regulation von Ionenkanälen über Rab27a wurde bisher nicht untersucht und ist - neben dem Einfluss von Best-1 auf die Ca^{2+} -Kanalfunktion - Gegenstand dieser Arbeit.

1.6. Fragestellung

Da die Sekretion von Wachstumsfaktoren im RPE über die Aktivierung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen und unter anderem von Rab27a reguliert wird, wurde der Frage nachgegangen, welchen Effekt die Rab27a auf die Aktivität von Ca_v1.3-Kanälen und die Sekretion von VEGF hat.

Eine verminderte Aktivität von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen im RPE führt zu einer gestörten Regulation der Zellfunktion und stellt somit einen Pathomechanismus dar. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die circadiane Phagozytoseaktivität über L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen, Maxi-K Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanälen und Best-1 reguliert wird [87].

Es besteht daher die Hypothese, dass mutantes Best-1 die Oberflächenexpression der Ca²⁺-Kanalpore durch einen gestörten zellulären Transport zur Zellmembran behindert und damit einen negativen Effekt auf die Ca²⁺-Kanalfunktion im RPE hat. Untersucht wurde die zelluläre Lokalisation der vier *Missense*-Mutanten von Best-1, R218C, T6P, F80L und F305S. Dabei wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss diese auf die Oberflächenexpression der Ca²⁺-Kanalpore sowie auf die Aktivität von L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen haben.

2. Material und Methoden

2.1. Methoden

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Immortalisierte Zelllinien

Als permanente, immortalisierte Zelllinien wurden Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1, ATCC, Wesel, Deutschland), *Cricetulus griseus*, sowie die humane retinale epitheliale Zelllinie (ARPE-19-Zellen, ATCC, Wesel, Deutschland) verwendet. ARPE-19 Zellen stammen aus dem gesunden RPE eines 19-jährigen Spenders [88]. Die Glykolysierung von CHO-K1-Zellen ähnelt der von neu synthetisierten Proteinen menschlicher Zellen [88]. Diese Zelllinie wurde für die heterologe Expression von Proteinen genutzt, da sie durch einen kurzen Zellzyklus und eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist und zudem in diesen Zellen die Oligomerisierung von Best-1 vergleichbar mit der in retinalen Pigmentzellen [88]. Die Zelllinien wurden bei -80 °C aufbewahrt und bei Bedarf in Kultur genommen. Alle Experimente wurden mit Zellen in Passage 3-20 durchgeführt. Die Kultivierung von CHO-K1-Zellen erfolgte im Nährmedium Ham's F-12 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS, PAA, Austria) und 1 % Penizillin/Streptomycin (P/S, PAA, Austria) bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Konzentration. ARPE-19 Zellen wurden im Nährmedium DMEM/F12 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) supplementiert mit 10 % FKS und 1 % P/S bei 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration kultiviert. Je nach Proliferation wurden die Zellen alle 2-4 Tage passagiert. Vor jeder Transfektion wurden die Zellen für 24 h serumfrei kultiviert.

2.1.1.2. Primäre RPE-Zellen: Etablierung der Isolation, Transfektion und Immunzytochemie

Ungebrühte Schweineaugen wurden mit Genehmigung des Bezirksamts Mitte von Berlin gemäß Artikel 23 der Verordnung VO (EG) 1069/2009 vom Schlachthof Färber in Neuruppin zur Verfügung gestellt. Die Augen wurden in frisches CO₂-unabhängiges Medium (CO₂ Independent Medium, Life Technologies, England) überführt, um den physiologischen pH-Wert unter atmosphärischen CO₂-Bedingungen (0,04 %) nach dem gekühlten Transport wiederherzustellen. Zur Vorbeugung von Kontamination, wurde das Medium mit 1 % P/S versetzt. Als erstes wurde jedes Auge vom umliegenden Muskelgewebe befreit und in frisches CO₂-unabhängiges Medium supplementiert mit 1 % P/S überführt. Die Augen wurden nacheinander zwei Mal für 2 min in Pursept (Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden alle Augen in frisches CO₂-unabhängiges Medium mit 1 % P/S überführt. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Zum Öffnen der Augen erfolgte ein Schnitt entlang der *Ora serrata*, der

kreisrunden Übergangslinie der Retina zum Ziliarkörper und zur Iris, mit einem spitzen Skalpell. Die Linse und der Glaskörper wurden entfernt und der leere Augenbecher wurde sofort mit sterilem 1 % P/S-/CO₂-unabhängigen Medium befüllt. Dadurch wurde das Austrocknen des Gewebes verhindert und der physiologische pH-Wert stabil gehalten. Die Augenbecher wurden für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um das Ablösen der Retina zu erleichtern. Die bereits leicht abgelöste Retina wurde an der Stelle des Sehnervs vorsichtig abgesaugt. Nach Entfernen der Retina wurden die Augenbecher unmittelbar mit sterilem 1 % P/S-/CO₂-unabhängigen Medium befüllt und anschließend zwei Mal für 1 min mit sterilen Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Medium durch eine Lösung aus 0,25 % Trypsin/Ethylendiaminotetraacetat (EDTA) in TRIS-gepuffertes Salzlösung (TBS) (Life Technologies, USA) ersetzt, um ein Dissoziieren der obersten Zellschicht der RPE-Zellen von der Bruch'schen Membran zu ermöglichen. Jedes Auge wurde mit 3 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung befüllt und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Trypsinierte RPE-Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren dissoziiert. Die Wirkung von Trypsin wurde mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, USA), supplementiert mit 20 % FKS und 1 % P/S, gestoppt. Hierzu wurden die dissoziierten Zellen aus der Pasteurpipette in vorgelegtes DMEM mit 20 % FKS und 1 % P/S pipettiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 500 g zentrifugiert. Unter Verwendung der Neubauer Zählkammer (Marienfeld Superior, Deutschland) wurde überprüft, ob sich im Überstand noch Zellen befinden. Der restliche Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1 ml DMEM mit 20 % FKS und 1 % P/S pro Auge resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig homogenisiert und anschließend über einen 100 µm Zellfilter (Sigma-Aldrich, Deutschland) vereinzelt. Es wurden 500 000 Zellen pro Transwell 6,5 mm Polyester Membran Inserts (3470, Corning, Deutschland) für die Transfektion und Immunzytochemie in einer 24-well-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C in 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde nach Inkubation gewechselt und durch 5 % FKS und 1 % P/S in DMEM ersetzt. Die Zellen wurden nach der Isolation im Nährmedium DMEM mit 20 % FKS und 1 % P/S für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration kultiviert. Vor der Transfektion wurde das Serum im Nährmedium auf 5 % FKS reduziert.

2.1.1.3. Humane RPE-Zellen aus induziert pluripotenten Stammzellen

Humane (h)RPE-Zellen wurden uns vom *Center for Regenerative Therapies* der TU Dresden (CRTD) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Zellen handelt es sich um *hRPE-Zellen*, die aus Hautfibroblasten zu pluripotenten Stammzellen induziert (iPSC) und von Tanaka am CRTD zu RPE-Zellen differenziert wurden [1] (Linie O27- 08 zur Verfügung gestellt von Yasuhiro Takashima und Austin Smith, Cambridge Universität, England). Die RPE-Zellen wurden auf Matrigel (BD Biosciences, Irland) beschichteten 12 mm-Deckgläschen in 12-well-Platten in

einem speziell auf das Wachstum von stammzellabgeleiteten RPE-Zellen ausgerichteten Nährmedium (DMEM-GlutaMax™ (Gibco, 31966-021), 20 % Knockout™ Serum Replacement (Gibco, 10828-028, Deutschland), nicht essentielle Aminosäuren (Gibco, 11140, Deutschland) und 1 mM L-Glutamin sowie 0,1 mM β -Mercaptoethanol) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Verwendung von Matrigel zur Beschichtung der Deckgläschen soll eine weitere Differenzierung der Zellen verhindern. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Vor der Transfektion wurde das Serum im Nährmedium auf 5 % FKS reduziert. Die Zellen wurden nicht passagiert, sondern bei einer Konfluenz von 60-90 % direkt einer Transfektion mit Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, USA) und anschließender Immunzytochemie unterzogen.

2.1.2. Molekularbiologische Methoden

2.1.2.1. Plasmid-Konstrukte

Die humanen Best-1-Konstrukte (*hBest-1*, *BEST-1* [*Homo sapiens*; NM_004183]) wurden von Weber (Regensburg) zur Verfügung gestellt. Mutantes *hBest-1* (R218C, T6P, F80L oder F305S) wurde von Reichhart und Milenkovic (Regensburg) über ortsspezifische Mutagenese generiert. Abhängig von den experimentellen Bedingungen wurden diese Mutationen mit einem verstärkten grün fluoreszierenden Protein (EGFP) am C-Terminus gekoppelt (*hBest-pEGFP-N1 R218C*, *hBest-pEGFP-N1 T6P*, *hBest-pEGFP-N1 F80L*, *hBest-pEGFP-N1 F305S*). Die Ca²⁺-Kanal-Konstrukte wurden von Striessnig (Innsbruck) bereitgestellt. Dazu gehören folgende Plasmide: *Cacna1d*, spannungsabhängiger L-Typ-Ca²⁺-Kanal, α_1 D-Untereinheit Ca_v1.3 [*Homo sapiens*: NM_000720.2], β_3 -Untereinheit [*Rattus norvegicus*; Gen ID NM_012828], β_4 -Untereinheit [*Rattus norvegicus*; Gen ID 25297 und 58942 sowie die $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit ($\alpha_2\delta_1$ -pcDNA3, Gene ID 776). Die verschiedenen β -Untereinheiten waren abhängig für die Detektion entsprechender Proteine an ein Polyhistidin- (His-) oder ein c-Myc gekoppelt. EGFP-pcDNA3 diente als Reporterplasmid für die Transfektionskontrolle.

2.1.2.2. Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Alle Plasmide wurden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in sterilem RNase-freiem Wasser bei 4 °C oder zusätzlich als Glycerolstocks (50 % Glycerol) bei -80 °C gelagert. Um die Qualität und die Reinheit im Besonderen der Ca_v1.3-Plasmide (250 kDa) zu gewährleisten, wurden die Konstrukte bei Bedarf in kompetente Bakterien (*Escherichia coli*, *E.coli*) mittels XL1-Blue Competent Cells (Agilent Technologies, USA) gemäß der Herstellerangaben transformiert.

2.1.2.3. Isolation von Plasmid-DNA

Neue Plasmid-Konstrukte aus bestehenden *E.coli*-Glycerolstocks wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelklone wurden am nächsten Tag gepickt und zur Vermehrung in einer ersten Vorkultur aus 4 ml Ampicillin-LB-Medium (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht inkubiert. Daraus

wurden anschließend 1,5 ml für die Isolation der Plasmid-DNA mittels Plasmid Mini-Kit (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die extrahierte DNA wurde nach dem Restriktionsverdau mittels Gelelektrophorese der Fragmentgröße nach aufgetrennt.

Nach einer zweiten Vorkultur wurde unter den gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben, der Klon mit den erwarteten Fragmentgrößen mit Hilfe des Midi Kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt (500 μ l der ersten Vorkultur in 250 ml Ampicilin-LB-Medium). Mit dem Midi-Kit können größere Mengen an Plasmid-DNA isoliert werden. Für die Herstellung eines neuen Glycerolstocks wurden an dieser Stelle 800 μ l der ersten Vorkultur mit 200 μ l sterilem 50 % Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert. Die gefällte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 100 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Konzentration und Qualität der isolierten DNA wurden mit Hilfe des NanoDrop 2000 spektrophotometrisch bestimmt (Thermo Fischer, USA). Die Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA erfolgte durch Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

2.1.2.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Agarose-Gelelektrophorese

Die Aufreinigung der Ca^{2+} -Kanäle Untereinheit, $\text{Ca}_v1.3$ (α_{1D}), wurde regelmäßig alle 6 Monate durchgeführt, da dieses Plasmid aufgrund seiner Größe von 250 kDa bei langer Lagerung instabil ist. Zusätzlich zur Plasmid-DNA, die für $\text{Ca}_v1.3$ kodiert, wurden auch Plasmide, die für Rab27a kodieren mit Hilfe von spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten. Das Schneiden von Plasmid-DNA (Restriktionsverdau) wurde gemäß den Herstellerangaben angesetzt (NEBcloner, New England BioLabs, USA). Für den Restriktionsverdau von $\text{Ca}_v1.3$ wurde das Restriktionsenzym *EcoRI* mit dem Puffer NEBuffer2.1 verwendet, für den Restriktionsverdau von Rab27a die Restriktionsenzyme *ArgI* und *KpnI* mit dem Puffer NEBuffer1.1 (New England BioLabs, USA). Der Restriktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei RT inkubiert und anschließend für die Gelelektrophorese vorbereitet. Die Elektrophorese erfolgte im 1% Agarose-Gel bei 90 V für 60 min in einem Puffer aus 2 M TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), 1 M Acetat und 50 mM EDTA (TAE-Puffer, versetzt mit 4 μ l Ethidiumbromid, Tabelle 11) in einer Elektrophoresekammer, Power Pac 1000 (Biorad, USA). Die Ladepuffer sowie Größenmarker wurden abhängig von der DNA-Größe ausgewählt (Tabelle 2). Die Chemilumineszenz von Ethidiumbromid wurde über ultraviolettes (UV-) Licht im Molecular Imager®-ChemiDoc™XRS (Biorad, USA) detektiert.

2.1.2.5. Mikroinjektion von Plasmid-DNA

Für immunzytochemische Färbungen und elektrophysiologische Messungen wurde Plasmid-DNA mittels Mikroinjektion in CHO-K1-Zellen injiziert. Dafür wurden die Zellen zuvor in niedriger Konfluenz (10 %) auf 12 mm-Deckgläschen ausgesät und für mindestens 24 h bei

37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Mikroinjektion sind CHO-K1-Zellen im Besonderen geeignet, da CHO-K1-Zellen endogen weder Ca_v1.3-Kanäle [2] noch Rab27a [3] bzw. Best-1 [4] exprimieren. Die entsprechenden Proteine wurden - abhängig vom Experiment - heterolog exprimiert. Die Mikroinjektion von Plasmid-DNA (50 ng/μl pro Plasmid) erfolgte über einen FemtoJet Injektor mit einem InjectMan NI 2 Mikromanipulator (beide Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter einem invertierten Mikroskop (Carl Zeiss). Die Messung von Ca²⁺-Strömen erfordert die Expression von allen Untereinheiten des Ca_v1.3-Kanals (α₂δ₁, β₄ bzw. β₃) sowie der porenformenden Einheit Ca_v1.3.

Für die heterologe Expression von Ca_v1.3-Kanälen mit oder ohne Rab27a wurden die Untereinheiten α_{1D}, α₂δ₁ und die β₃ zusammen mit GFP und mit oder ohne Rab27a in subkonfluente CHO-K1-Zellen injiziert. Für die Messung von Ca²⁺-Strömen in ARPE-19 Zellen wurde Rab27a und GFP alleine injiziert, da ARPE-19-Zellen funktionales Ca_v1.3 endogen exprimieren [5]. Für die heterologe Expression von Ca_v1.3-Kanälen zusammen mit *hBest-1* wurden die Untereinheiten α_{1D}, α₂δ₁ und die β₄ zusammen mit WT oder mutantem *hBest-1* (R218C, T6P, F80L oder F305S) und GFP in subkonfluente CHO-K1-Zellen injiziert.

Nach erfolgter Mikroinjektion wurden die Zellen über Nacht bei 30 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei dieser Temperatur war die Transfektion der 250 kDa großen Ca_v1.3-Untereinheit am effizientesten. Anschließend wurden die Zellen in 37 °C und 5 % CO₂ überführt. Injizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert.

2.1.2.6. Transfektion mittels Lipofektion

Für Koimmunpräzipitationen (Co-IPs) und immunzytochemische Färbungen an, primären Schweine und humanen RPE-Zellen, für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) an primären ssRPE-Zellen sowie für das antikörperbasierte Nachweisverfahren, ELISA, an ARPE-19 wurden die Zellen auf Deckgläschen mit einer Zelldichte von 70-90 % Konfluenz transfiziert. Alle Transfektionen erfolgten immer 24 h nach dem Aussäen der Zellen und wurden gemäß dem Herstellerprotokoll mit Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, USA) im Verhältnis von 1 zu 2 (DNA zu Lipofektionsreagenz) durchgeführt.

Für die Co-IPs von Ca_v1.3 und Rab27a wurden subkonfluente CHO-K1-Zellen mit β₃, α_{1D} und c-Myc-gekoppeltem Rab27a transfiziert. Für die Co-IP von Ca_v1.3 und *hBest-1* wurden β₄, α_{1D} zusammen mit dem WT oder mutantem *hBest-1* (R218C, T6P, F80L oder F305S) in subkonfluente CHO-K1-Zellen transfiziert. Für die immunzytochemischen Färbungen von Ca_v1.3 Kanälen und Best-1 an primären Schweine und humanen RPE-Zellen wurde - je nach Fragestellung GFP-gekoppeltes, wildtypisches (WT) oder mutantes *hBest-1* (R218C, T6P, F80L oder F305S) transfiziert. In Tabelle 2.6 sind alle verwendeten Plasmide aufgelistet, die verwendet wurden.

Nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht bei 30 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei dieser Temperatur war die Transfektionseffizienz der 250 kDa großen Ca_v1.3-Untereinheit am größten. Anschließend wurden die Zellen in 37 °C und 5 % CO₂ überführt. Transfizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert.

2.1.2.7. RT qPCR an primären RPE-Zellen

Die quantitative Bestimmung der endogenen Expression von Best-1 in primären Schweine (*sus scrofa*, ss) RPE-Zellen wurde durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt für die Transfektion sowie Fixierung bzw. Detektion von Best-1 zu ermitteln. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT qPCR). Bei der RT qPCR wird das Fluoreszenzsignal proportional während der Amplifikation der PCR-Produkte gemessen [6], wobei die emittierte Fluoreszenz bei jedem Zyklus als ein Parameter für die Amplifikation der Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält, detektiert wird [7]. In diesem Zusammenhang wurde die produktabhängige Fluoreszenz über den unspezifisch an doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Sigma Aldrich, Deutschland) gemessen.

Für das Experiment wurden primäre ssRPE-Zellen nach der Isolierung aus Schweineaugen auf 24-well-Platten ausplattiert und zu drei verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h sowie 72 h nach dem Aussäen der Zellen) lysiert (RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit, Qiagen, Deutschland). Als Kontrollen wurden untransfizierte CHO-K1-Zellen als Negativ-Kontrolle benutzt. Humane RPE-Zellen, die aus iPSC zu RPE-Zellen differenziert wurden, wurden als Positiv-Kontrolle verwendet. Aus den erhaltenen Zelllysaten wurde die RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurden mit Hilfe des NanoDrop 2000 spektrophotometrisch (Thermo Fischer, USA) bestimmt. Jeweils 1 µg der Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des QuantiTect-Kits für Reverse Transkriptase (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die PCR-Reaktion wurde das SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Die Messung der mRNA-Expressionslevel erfolgte mit dem Rotorgene Q (Qiagen) mit folgendem Temperaturprofil: initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 min, gefolgt von 40-maliger Wiederholung der Abfolge bei 95 °C für 15 s, 60 °C für 20 s und 72 °C für 2 min.

Die Ergebnisse der RT qPCR sind im Anhang in Abbildung 3 dargestellt. Nach 24 h ist die Expression von Best-1 am höchsten und nimmt anschließend stetig ab. Die Zellen wurden daher für immunzytochemische Antikörperfärbungen 24 h nach Transfektion fixiert. Elektrophysiologische Messungen von heterolog exprimierten Ca_v1.3-Kanälen wurden nach 24 bis 36 h nach Mikroinjektion durchgeführt.

2.1.3. Immunzytochemische Antikörperfärbungen

An CHO-K1- und ARPE-19-Zellen

Nach dem Fixieren der Zellen für 10 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA, Sigma Aldrich, Deutschland) in TBS wurden die Zellen auf Deckgläschen aus Glas mit 0,5 % TritonX100 für 10 min permeabilisiert. Für das Blocken unspezifischer Epitope wurden die Zellen in einer Lösung aus 5% Bovine Serum Albumin (BSA) in TBS (pH 7,4) für 40 min inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte in einer Lösung aus 0,8 % BSA in TBS für 45 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C sowie mit Sekundärantikörpern für 1 h bei RT (Tabelle 2.3.). Die Zellkerne wurden mit dem nukleären Marker 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:5000, 10 min bei RT) markiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorescence Mounting Medium (Dako, Deutschland) auf Objektträgern eingebettet und mindestens 2 h bei 4 °C gelagert, bis sie für die Analyse der subzellulären Lokalisation am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Deutschland) vorbereitet wurden.

Für die immunzytochemische Färbungen an CHO-K1- und ARPE-19-Zellen wurden folgende Primärantikörper verwendet: *goat* anti- $\text{Ca}_v1.3$ (1:100), *rabbit* anti- β_3 (1:500), *mouse* anti-c-Myc (1:500), *rabbit* anti-c-Myc (1:200) (Material, Tabelle 2.3). Als Oberflächenmarker für CHO-K1-Zellen [8] diente der Primärantikörper gegen $\alpha_5\beta_1$ Integrin (*rabbit* anti- $\alpha_5\beta_1$ Integrin, 1:250). $\alpha_5\beta_1$ Integrin ist ein ubiquitär in der Zellmembran vorkommender Fibronektin-Rezeptor [12]. Die entsprechenden Sekundärantikörper (*donkey*, *rabbit* oder *goat* anti-*mouse*, konjugiert mit Alexa Fluor 488, 546, 633 oder 647 (Life Technologies, Deutschland), wurden in einer Verdünnung von 1:5000 für 1 h bei RT inkubiert.

An RPE-Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert und mit 5 % TritonX100 für 10 min bei RT permeabilisiert. Mit dem Ziel, unspezifische Epitope zu blocken, wurden die Zellen in einer 5 % BSA/TBS-Lösung für 40 min bei RT inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper (*goat* anti-GFP FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-konjugiert (1:200), *mouse* anti-Bestrophin (1:500), *goat* anti- $\text{Ca}_v1.3$ (1:100), *rabbit* anti- $\text{Ca}_v1.3$ (1:100), *rabbit* anti-c-Myc (1:500), *mouse* anti- β -Catenin (1:100)) wurden in einer 0,8 % BSA/TBS-Lösung verdünnt. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert und am nächsten Tag 3-mal für jeweils 5 min mit TBS gewaschen. Nun folgte eine Inkubationszeit der Sekundärantikörper von 1 h bei RT. Dafür wurden folgende Sekundärantikörper eingesetzt: *goat* anti-*mouse* 546 (1:500), *donkey* anti-*mouse* 647 (1:2500), *donkey* anti-*goat* 594 (1:2500), *donkey* anti-*rabbit* 647 (1:500), *donkey* anti-*rabbit* 488 (1:2500). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (1:5000) für 10 min bei RT. Anschließend wurden die Zellfilter (100 μm , Sigma Aldrich, Deutschland)

nach erneutem 2-maligen Waschen für jeweils 5 min mit TBS mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten und auf Objektträgern mit Hilfe von Deckgläschen im Fluorescence Mounting Medium (Dako, Deutschland) eingebettet. Die fertigen Objektträger wurden bei 4°C gelagert.

2.1.3.1. Korrelationsanalyse nach *Pearson*

Die Analyse der Korrelation von Ca_v1.3, Rab27a oder Best-1 mit den Plasmamembran-Markern, β-Catenin oder α₅β₁ Integrin wurde anhand des Plugins JACoP (ImageJ Software) zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach *Pearson* (PCC) [9] berechnet. Der PCC gehört zu den Standardtechniken, die angewandt wird, um übereinanderliegende Muster zu erkennen. Damit lässt sich Korrelation der Intensitätsverteilungen zwischen einzelnen Kanälen beschreiben. Der PCC gibt die Korrelation gleicher Strukturen in zwei Kanälen an und ist nicht abhängig von den Intensitätswerten der Pixel. Die Werte des PCC liegen im Bereich von -1 und +1, wobei -1 keine Korrelation und +1 eine positive Korrelation angibt. Für jede Analysebedingung wurden mindestens n = 4 und maximal n = 23 Zellen ausgesucht. Die Analyse wurde ausschließlich an Einzelzellen aus konfokalmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Durch Ausschneiden des zytoplasmatischen Kompartiments per Freihandwerkzeug mit Hilfe der ImageJ Software wurde der PCC in der Plasmamembran der Zellen berechnet.

2.1.3.2. Pixelanalyse über *edge detection*

Die Oberflächenexpression in den konfokalen Bildern wurde mit Hilfe der ImageJ Software analysiert und einer Pixelanalyse, der sogenannten *edge detection*, unterzogen (Abbildung 9). Einzelzellen wurden ausgesucht, wobei die Zellmembran und intrazelluläre Regionen manuell mit dem Freihandwerkzeug ausgeschnitten und als Region des Interesses (ROI) definiert wurden. Die Gesamtanzahl der Pixel wurde mittels des Befehls *analyze particles* für jeden Kanal einzeln berechnet. Die Anzahl der Pixel der gesamten Zelle wurde von der Anzahl der intrazellulären Regionen subtrahiert, um die relative Anzahl der Pixel in der Zellmembran zu ermitteln. Außerdem wurden die Pixel in der Zellmembran durch die Anzahl der intrazellulär gelegenen Pixel dividiert, um somit die relative Oberflächenexpression zu definieren.



Abbildung 9: Pixelanalyse über *edge detection* an primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. RPE Zelle nach Transfektion mit der hBest-1 Mutante F305S, der β₄- und Ca_v1.3-Untereinheit nach immunozytochemischer Färbung gegen den Plasmamembran-Marker α₅β₁ Integrin (links) und Best-1 (rechts). Mit Hilfe der Software ImageJ wurde die Pixelanzahl in den beiden Regionen des Interesses, Plasmamembran (links) und Zytoplasma (rechts) bestimmt.

2.1.3.3. Apikal-basolaterale Orientierung in polarisierten RPE-Zellen

In polarisierten Zellen wird Best-1 in der basolateralen Membran exprimiert. Um zu analysieren, ob Mutationen von Best-1 nach Transfektion in ssRPE-Zellen basolateral oder apikal exprimiert werden, wurden die *Z-stacks* der konfokalen Bilder nach immunzytochemischer Färbung unter Verwendung eines *score* analysiert. Der *score* 1 wurde für die basolaterale Lokalisation gewählt, während der *score* 2 die apikale Lokalisation definierte. Die Analyse erfolgte verblindet. Ausgewertet wurden $n = 6$ Zellen pro Mutante bzw. WT. Die Werte aus den Mutanten wurden auf die Werte von WT Best-1 normalisiert.

Die Detektion aller in dieser Arbeit angefertigten immunzytochemischen Färbungen erfolgte am konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Göttingen, Deutschland). Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der Software ZEN (Zeiss 2009, Deutschland) durchgeführt. Konfokale Bilder wurden anhand der ImageJ Software (National Institute of Health, USA) qualitativ analysiert.

2.1.4. Koimmunpräzipitationen (Co-IPs)

2.1.4.1. Zellyse, Western Blot und SDS-Gelelektrophorese

Die Zellen wurden mittels Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst, im Medium gelöst und für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml eiskaltem Lysepuffer siehe 2.7.1. und 2.7.2. homogenisiert, für 20 min geschüttelt und für weitere 20 min bei 13000 g und bei 4 °C zentrifugiert. 100 μ l des Homogenats wurden als Lysefraktion (L) aufbewahrt, während die restlichen 900 μ l mit Protein G-Agarose-Beads (Roche Applied Science, Deutschland) für 30-60 min vorinkubiert wurden, mit dem Ziel eine unspezifische Bindung der Protein G-Agarose-Beads an die Immunpräzipitationsfraktion (IP-Fraktion) auszuschließen. Für die Koimmunpräzipitation (Co-IP) gegen die Untereinheit β_4 -His wurden Cobalt-Beads HisPur™ (Cobalt Resin, Thermo Fisher Scientific) verwendet, da diese unmittelbar an His-markierte Proteine binden. Nach einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt wurden 7-15 μ l des entsprechenden Primärantikörpers (Tabelle 2.3) zusammen mit dem Überstand in 60 μ l Protein-G-Agarose respektive HisPur™ über Nacht bei 4 °C auf einem Inkubationsschüttler inkubiert (*rabbit* anti-c-Myc (1:200), *rabbit* anti-Ca_v1.3 (1:100) oder *goat* anti-Ca_v1.3 (1:100), *rabbit* anti-His (1:500) und *mouse* anti-Best-1). Am nächsten Tag wurde die IP-Fraktion bei 1000 g für 1 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Nicht-gebundene (NB) Fraktion aufbewahrt. Das Zellpellet wurde 4-mal mit jeweils 1 ml Waschpuffer (Tabelle 3.1) gewaschen, 10 min bei 4°C geschüttelt und erneut bei 1000 g für 1 min und bei 4 °C zentrifugiert. Bei dem letzten Waschschrift wurden 50 μ l des Überstandes (IP) für die weiteren Schritte aufgehoben und der Rest verworfen. Für die Co-IP gegen die Untereinheit β_4 -His wurden 10 mM Imidazol zum Waschpuffer hinzugegeben (Tabelle 3.1). Anschließend wurden 30 μ l 4-fach-Natriumlaurylsulfat (SDS) und 3 μ l β -Mercaptoethanol zu jeweils 50 μ l der L-, NB- und der IP-Fraktion hinzugeben und

gemischt. Die drei Fraktionen wurden bei 37 °C für 40 min denaturiert und gemischt. Nach einer SDS-Gelelektrophorese mit 7-12 % Polyacrylamid wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Transfermembran (GE Healthcare, Deutschland) übertragen. Die Membranen wurden in PBS-T (PBS mit Tween20) gewaschen, um mögliche Gelreste zu entfernen. Für das Blockieren von unspezifischen Epitopen wurden die Membranen 5 % Trockenmilchpulver (Sigma Aldrich) für 1 h bei RT inkubiert. β -Aktin (*mouse anti- β -Actin*, 1:5000) wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Western Blots (WBs) wurden mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 2.3) in 0,05 % TBS-T (TBS mit Tween20) über Nacht bei 4 °C inkubiert (*rabbit anti-c-Myc* (1:500) oder *mouse anti-c-Myc* (1:500); *goat* oder *rabbit anti- $\text{Ca}_v1.3$* (1:100); *goat anti-Rab* (1:250); *rabbit anti-His* (1:500); *mouse anti-Best-1* (1:500); Material, Tabelle 2.3). Für die Visualisierung transferierten Proteine wurden spezifische Merrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte Sekundärantikörper (New England Biolabs, USA) verwendet (*donkey anti-rabbit* (1:2500); *rabbit anti-goat* (1:5000); *sheep anti-mouse* (1:5000); *chicken anti-goat* (1:5000)), über Chemilumineszenz verstärkt (Detektionsreagenz Clarity™ Western ECL Substrate, Biorad) und gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des Molecular Imager-ChemiDocTmXRS (Biorad, USA) detektiert.

In den WBs konnten unspezifische Degradationsbanden durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren bei der Lyse der Zellen oder durch längere Inkubationszeiten der Blockierlösungen für die Antikörperfärbung nicht vermieden werden.

Für die Co-IP gegen $\text{Ca}_v1.3$ und Rab27a

Transfizierte Zellen wurden mit den Lysepuffern (150 mM TRIS-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % Nonidet-P40; 0,5 % Natriumdesoxycholat und 1 Tablette Complete Mini Proteininhibitor-Mixtur (Roche Applied Science, Deutschland)) lysiert. Für die Co-IP der $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit wurde der Lysepuffer unter Zugabe von Aprotinin (1:1000, Sigma Aldrich, USA), einem pankreatischen Trypsin-Inhibitor, und einer Proteaseinhibitor-Lösung (PIC, 1:100) nach Rosenthal [10] verwendet.

Für die Co-IP gegen $\text{Ca}_v1.3$ und Best-1

Jede *hBest-1*-Mutante und der WT wurden mindestens 3-mal in CHO-K1-Zellen transfiziert und kopräzipitiert, jeweils gegen β_4 -His und gegen die $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit. Transfizierte CHO-K1-Zellen wurden auf 10 mm-Kulturschalen für 36 h bei 37 °C kultiviert und anschließend mit dem Lysepuffer nach Rosenthal [10] - unter Zugabe von Aprotinin (1:1000, Sigma Aldrich, USA) und einer Proteaseinhibitor-Lösung (PIC, 1:100) nach Rosenthal [10] - lysiert.

2.1.4.2. Quantifizierung der Co-IP-Effizienz

Die Effizienz der Co-IPs wurde anhand der WBs ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer densitometrischen Analyse mithilfe der ImageJ Software (National Institute of Health, USA). Dabei wurde jeweils das Verhältnis aus der IP-Bande und der jeweiligen L-Bande ermittelt. Zusätzlich wurde die Anzahl der erfolgreichen Co-IPs für jede Mutante bestimmt: zum einen die Co-IP gegen β_4 -His und zum anderen gegen $Ca_v1.3$. Berechnet wurde hierbei die Anzahl der positiven Interaktionen bei Co-IPs in Abhängigkeit zu der Gesamtanzahl der durchgeführten Co-IPs mit der jeweiligen *hBest-1* Mutante respektive mit WT *hBest-1*. Als positive IP wurde die IP bezeichnet, bei der der anschließende WB eine Bande in der IP-Fraktion zeigte. Insgesamt wurden $n = 18$ Co-IPs (WT und alle Mutanten von *hBest-1*) gegen $Ca_v1.3$ durchgeführt, wovon 45 % erfolgreich waren. Gegen β_4 -His wurden insgesamt $n = 19$ Co-IPs (WT und alle Mutanten von *Best-1*) durchgeführt, wovon 79 % erfolgreich waren.

2.1.5. Messung der VEGF-Sekretion mittels ELISA

Der Einfluss von Rab27a auf die VEGF-Sekretion in ARPE-19 Zellen wurde in einem ELISA analysiert. Konfluente ARPE-19 Zellen wurden für 24 h serumfrei kultiviert, um anschließend mit Rab27a - wie weiter oben beschrieben - transfiziert oder stimuliert zu werden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml IGF-1 (Thermo Scientific, USA) für 4 h bei 37 °C, mit 10 ng/ml bFGF (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) für 8 h bei 37 °C sowie mit 10 μ M respektive ohne Nifedipin (Sigma-Aldrich, Deutschland) für 8 h bei 37 °C. Anhand des *Quantikine ELISA Human VEGF Immunoassay* (R&D Systems, USA) wurde die Konzentration von sezerniertem VEGF (von jeweils 10^5 Zellen) im Medium gemäß den Angaben des Herstellers gemessen.

2.1.6. Elektrophysiologische Messungen an L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanälen

Alle *Patch-Clamp*-Messungen wurden in Ganzzellableitung (*Whole-Cell*-Konfiguration) nach Neher und Sakmann zur Messung von L-Typ- Ca^{2+} -Strömen durch heterolog exprimierte $Ca_v1.3$ -Kanäle an CHO-K1-Zellen durchgeführt [89]. Die Messungen erfolgten am EPC10-Verstärker (HEKA, Lambrecht/ Pfalz, Deutschland) bei RT. Die Messungen wurden anhand der TIDA 5.22 Software (HEKA) analysiert. Pipetten aus Borosilikatglas (innerer Durchmesser 1,05 mm, äußerer Durchmesser 1,50 mm und Länge 80 mm (Science Products, Hofheim, Deutschland)) wurden mit einem Universal-Elektrodenpuller (Zeitz, Augsburg, Deutschland) gezogen, sodass die Pipetten nach dem Befüllen mit den jeweiligen intrazellulären Lösungen (Tabelle 9, 10) einen Zugangswiderstand von 2-5 M Ω erreichten. Der Barium-Einstrom (I_{Ba}) durch $Ca_v1.3$ Kanäle wurde abhängig vom Experiment mit den angegebenen extrazellulären Lösungen (Tabelle 9, 10) gemessen. Für die elektrophysiologischen Messungen wurde eine Reihe von Testdepolarisationen bis zu 20 mV mit +10 mV Anstieg und 50 ms Dauer bei einem Haltepotential von -70 mV angewandt.

Lineare Leckströme wurden von den Rohströmen anhand von Hyperpolarisationspulsen (-80 bis -160 mV in 10 mV Schritten) subtrahiert. Nach dem Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration erfolgte die Aufhebung der Membrankapazität und der Serienwiderstand R_s wurde kompensiert, um einen effektiven R_s von $\leq 10 \text{ M}\Omega$ zu gewährleisten. Die Strom-Spannungsabhängigkeit von $\text{Ca}_v1.3$ Kanälen wurde als Strom-Spannungskennlinie dargestellt. Dazu wurde der gemessene I_{Ba} in Abhängigkeit vom Maximalstrom (I_{max}) als relative Stromamplitude I/I_{max} (y-Achse) für jeden Spannungssprung bestimmt und gegen das entsprechende Membranpotential in mV (x-Achse) aufgetragen. Die spannungsabhängige Aktivierung von $\text{Ca}_v1.3$ Kanälen wurde anhand der Strom-Spannungsabhängigkeit mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung berechnet

$$I = [1 + \exp \{(V_{0.5}-V)/k_{act}\}]^{-1},$$

wobei V das Membranpotential, I (entspricht hier I_{Ba}) den Strom durch $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle, $V_{0.5}$ die Spannung für die halbmaximale Aktivierung und k_{act} den Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion angeben. Der zeitliche Verlauf der Stromaktivierung wurde über folgende Exponentialfunktion berechnet

$$I(t) = A_0 \times \exp(-t/\tau_{act}) + C,$$

wobei $I(t)$ den Strom zum Zeitpunkt t nach Beginn der Depolarisation, A_0 den Aktivierungskoeffizienten, τ_{act} die Aktivierungszeitkonstante und C den Maximalstrom angeben.

Da die Stromantwort einer Zelle proportional zur Zellgröße ist, wurden die Stromdichten aus dem Quotienten (pA/pF) vom Gesamtstrom der Zelle (in pA) und der Zellkapazität (in pF) berechnet. Dadurch wurden die gemessenen Ströme normiert und für die Auswertung vergleichbar gemacht. Stromdichten mit einem negativen Vorzeichen sind als Einwärtsströme definiert, die nach Depolarisation der Zelle gemessen wurden.

2.1.7. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) gezeigt, wenn nicht anders angegeben. Das Signifikanzniveau wurde als p -Wert angegeben. p -Werte kleiner als 0,05 wurden gemäß dem zweiseitigen nicht gepaarten *Student's t-Test* mit Hilfe von GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., USA) und SigmaPlot 11 (Systat Software, England) als statistische Signifikanzen definiert. Die Signifikanz mit einem p -Wert von 0,05 wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet; die Signifikanz mit einem p -Wert von 0,01 mit einem doppelten Stern (**) und die Signifikanz mit einem p -Wert von 0,001 mit einem dreifachen Stern (***). n gibt abhängig vom Experiment jeweils die Anzahl der Zellen oder der Experimente an. Alle Experimente wurden mindestens 3-mal wiederholt.

2.2. Material

2.2.1. Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Name	Hersteller	Land
EPC10-Verstärker	HEKA	Deutschland
Invertiertes Mikroskop	Carl Zeiss	Deutschland
Laser Scanning Microscope, LSM 510	Zeiss	Deutschland
FemtoJet Injektor	Eppendorf	Deutschland
InjectMan NI 2 Mikromanipulator	Eppendorf	Deutschland
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele, Power Pac 1000	Bio-Rad	USA
Elektrophoresesystem für Polyacrylamid-Gele, Mini Protean® Tetra System	Bio-Rad	USA
Inkubationsschüttler Orbital Incubator S150	Stuart	Deutschland
Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler	Deutschland
Überkopfschüttler SB2 Rotator	Stuart	Deutschland
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad	USA
PCR-Gerät iCycler	Bio-Rad	USA
Rotorgene Q	Qiagen	Deutschland
Präzisionswaage LA 310 S	Sartorius	Deutschland
Sicherheitswerkbänke HERA safe	Heraeus	Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific	USA

2.2.2. Verbrauchsmittel

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmittel.

Produkt	Hersteller	Land
Universal-Elektrodenpuller	Zeitz	Deutschland
Pipetten aus Borosilikatglas	Science Products	Deutschland
12-well-Zellkulturplatten Falcon	Corning	Deutschland
24-well-Zellkulturplatten Falcon	Corning	Deutschland
Fließpapier, dick	Bio-Rad	USA
Deckgläser, 12 mm und 15 mm	Thermo Fisher Scientific	USA
Impfösen Ino-Loop 1µl	Simport	Kanada
Objektträger, Menzelgläser	Thermo Fisher Scientific	USA
Polypropylenröhrchen, 14 ml Falcon	Corning	Deutschland
Polystyrenröhrchen, 15 ml und 50 ml Falcon	Corning	Deutschland
PVDF-Transfermembran für Proteine	GE Healthcare	England
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf	Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ² Falcon	Corning	Deutschland
Zellkultur-Petrischalen 100 mm Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific	USA
Zellschaber 25 cm 2-position blade	Sarstedt	Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior	Deutschland
Transwell 6,5mm Polyester Membran Inserts (3470)	Corning	Deutschland
Sterile Zellfilter, sterile cell strainer size 100µm	Sigma-Aldrich	Deutschland

Substanz	Hersteller	Land
Paraformaldehyd, PFA	Sigma-Aldrich	Deutschland
Triton-X100	Sigma-Aldrich	Deutschland
Cobalt-Beads HisPur™ Cobalt Resin	Thermo Fisher Scientific	USA
Protein G-Agarose-Beads	Roche Applied Science	Deutschland
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	USA
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific	USA
Probenpuffer 4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	USA
Quick Load® Purple 2 Log DNA Ladder	New England BioLabs	USA
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England BioLabs	USA
non fat milk powder	Sigma-Aldrich	Deutschland
IGF-1	Thermo Fisher Scientific	USA
bFGF	BD Biosciences	Deutschland
Nifedipin	Sigma-Aldrich	Deutschland
SYBR Green I	Sigma-Aldrich	Deutschland
Goat Serum	Sigma-Aldrich	Deutschland
Bovine Serum Albumin, BSA	Sigma-Aldrich	Deutschland
Glycerol (1,2,3-Propanetriol, Glycerin)	Sigma-Aldrich	Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Biolegend	USA

2.2.3. Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immunzytochemie und Western Blot.

Primärantikörper	Klon	Konjugiert	Spezies	Konzentration	Hersteller	Land
Bestrophen-1	monoklonal	aufgereinigt	mouse	1:500	Abcam	England
GFP	polyklonal	FITC	goat	1:200	Abcam	England
β ₃	polyklonal	aufgereinigt	rabbit	1:500	Abcam	England
His	polyklonal	aufgereinigt	rabbit	1:500	Abcam	England
c-Myc	polyklonal	aufgereinigt	rabbit	1:200	Abcam	England
c-Myc	monoklonal	aufgereinigt	mouse	1:500	Hybridoma Bank	USA
Ca _v 1.3	polyklonal	aufgereinigt	goat	1:100	Santa Cruz	USA
Ca _v 1.3	polyklonal	aufgereinigt	rabbit	1:100	Alomone Labs	Israel
Rab27a	polyklonal	aufgereinigt	goat	1:250	Sicgen	Portugal
α ₅ β ₁ Integrin	polyklonal	aufgereinigt	rabbit	1:250	Biorbyt	England
β-Catenin	polyklonal	aufgereinigt	mouse	1:100	Cell Signalling	USA
β-Aktin	monoklonal	aufgereinigt	mouse	1:5000	Sigma Aldrich	Deutschland

Sekundärantikörper	Konjugiert	Spezies	Konzentration	Hersteller	Land
anti-mouse 546	Alexa Fluor	goat	1:500	Life Technologies	Germany
anti-mouse 647	Alexa Fluor	donkey	1:2500	Life Technologies	Germany
anti-goat 594	Alexa Fluor	donkey	1:2500	Life Technologies	Germany
anti-rabbit 647	Alexa Fluor	donkey	1:500	Life Technologies	Germany
anti-rabbit 488	Alexa Fluor	donkey	1:2500	Life Technologies	Germany
anti-rabbit	Peroxidase	goat	1:5000	Cell Signalling	USA
anti-mouse igG	Peroxidase	goat	1:5000	GE Healthcare	UK
anti-goat	Peroxidase	donkey	1:1000	Santa Cruz	USA

Sekundärantikörper	Konjugiert	Spezies	Konzentration	Hersteller	Land
anti-mouse 546	Alexa Fluor	goat	1:500	Life Technologies	Deutschland
anti-mouse 647	Alexa Fluor	donkey	1:2500	Life Technologies	Deutschland
anti-goat 594	Alexa Fluor	donkey	1:2500	Life Technologies	Deutschland
anti-rabbit 647	Alexa Fluor	donkey	1:500	Life Technologies	Deutschland
anti-rabbit 488	Alexa Fluor	donkey	1:2500	Life Technologies	Deutschland
anti-rabbit	Peroxidase	goat	1:5000	Cell Signalling	USA
anti-mouse igG	Peroxidase	goat	1:5000	GE Healthcare	England
anti-goat	Peroxidase	donkey	1:1000	Santa Cruz	USA

Sekundärantikörper	Konjugiert	Spezies	Konzentration	Hersteller	Land
anti-rabbit	HRP	donkey	1:2500	GE Healthcare	England
anti-mouse	HRP	sheep	1:5000	GE Healthcare	England
anti-goat	HRP	rabbit	1:5000	Millipore	USA
anti-goat	HRP	chicken	1:5000	Life Technologies	Deutschland

2.2.4. Zelllinien und primäre Zellen

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen.

Zelllinien	Bezugsquelle
ARPE-19 Zellen	ATCC #CRL-2302
CHO-K1 Zellen	ATCC #CCL-61
<i>Escherichia coli</i> , XL1 Blue Competent Cells	Agilent Technologies #200249
Primäre Zellen	Bezugsquelle
RPE Zellen aus dem Schweineauge	Färber Schlachtbetrieb, Neuruppin
induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) derived RPE	iPSC Linie O27- 08, University of Cambridge

2.2.5. Kits und Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Kits und Enzyme.

Name	Hersteller	Land
Quantikine ELISA Human VEGF Immunoassay	R&D Systems	USA
Complete Mini protein inhibitor mixture, Tabletten	Roche Applied Science	Deutschland
Detektionsreagenz Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad	USA
Chemilumineszenz Kit	Thermo Fisher Scientific	USA
GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit	Roboklon	Deutschland
Lipofectamine® 2000 Reagent	Invitrogen	USA
Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen	Deutschland
Plasmid Mini Kit	Qiagen	Deutschland
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific	USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Deutschland
SYBR Green PCR Kit	Qiagen	Deutschland
QuantiTect-Kits für Reverse Transkriptase	Qiagen	Deutschland
Restriktionsenzyme (<i>EcoRI</i> , Argel, KpnI)	New England BioLabs	USA
Puffer NEBuffer1.1, 2.1	New England BioLabs	USA

2.2.6. Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide.

Konstrukt	Hergestellt von	Spezies
hBest-1 WT	A. D. Marmorstein (Rochester, USA)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 WT c-Myc	Weber (Regensburg)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 WT EGFP	Weber (Regensburg)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 F305S pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 F80L pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 R218C pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 T6P pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 F305SEGFPN1	Buccichowski (Berlin)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 F80LEGFPN1	Buccichowski (Berlin)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 R218CEGFPN1	Buccichowski (Berlin)	<i>Homo sapiens</i>
hBest-1 T6PEGFPN1	Buccichowski (Berlin)	<i>Homo sapiens</i>
Rab27a pCDNA3.1 (+)6xHis	V. Milenkovic (Regensburg)	<i>Homo sapiens</i>
EGFP pCDNA3	V. Milenkovic (Regensburg)	<i>Escherlichia Coli</i>
α_{1D} -Untereinheit $Ca_v1.3$	Striessnig (Innsbruck)	<i>Homo sapiens</i>
β_3 -Untereinheit	Striessnig (Innsbruck)	<i>Rattus norvegicus</i>
β_4 -Untereinheit	Striessnig (Innsbruck)	<i>Rattus norvegicus</i>
β_3 mit Tag	Striessnig (Innsbruck)	<i>Rattus norvegicus</i>
β_4 -His	Striessnig (Innsbruck)	<i>Rattus norvegicus</i>
$\alpha_2\delta_1$ -pCDNA3	Striessnig (Innsbruck)	<i>Rattus norvegicus</i>

2.2.7. Primer

Tabelle 7: Verwendete Primer. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Fw: vorwärts, Rw: rückwärts; ss: *sus scrofa*

Gen	Abkürzung	Spezies	Primersequenz
Bestrophin-1	ssBest1-Fw	<i>Sus scrofa</i>	CCT GGC TTG TCT GGT TGG
	ssBest1-Rw	<i>Sus scrofa</i>	AGT TTC GTC TTT GAG TTT GTC C
GAPDH	ssGAPDH-Fw	<i>Sus scrofa</i>	GGTGAAGGTCGGAGTGAACG
	ssGAPDH-Rw	<i>Sus scrofa</i>	TGGGTGGAATCATACTGGAACA

2.2.8. Software

Tabelle 8: Verwendete Software.

Name	Hersteller	Land
ImageJ	National Institute of Health	USA
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software Inc.	USA
TIDA 5.22 Software	HEKA	Deutschland
ZEN Software	Zeiss	Deutschland
SigmaPlot 11	Systat Software	England

2.2.9. Lösungen für Patch-Clamp Messungen

Tabelle 9: Verwendete Lösungen für die Messung von Ca^{2+} -Strömen an CHO-K1-Zellen. Intrazelluläre Pippettenlösung (links) und extrazelluläre Badlösung (rechts), jeweils pH7,4. CsCl: Cäsiumchlorid, MgCl_2 : Magnesiumchlorid, CsEGTA: Cäsium-Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure, $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}\cdot\text{Cl}$: Cholinchlorid, BaCl_2 : Bariumchlorid, HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinethansulfonsäure.

Substanz	Konz. [mM]
CsCl	135
MgCl_2	1
CsEGTA	10

pH7,4

Substanz	Konz. [mM]
$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}\cdot\text{Cl}$	150
BaCl_2	15
MgCl_2	1
HEPES	10

pH7,4

Tabelle 10: Verwendete Lösungen für die Messung von Ca^{2+} -Strömen an ARPE19-Zellen. Intrazelluläre Pippettenlösung (links) und extrazelluläre Badlösung (rechts) (nach Rosenthal [10]), jeweils pH7,4. CsCl: Cäsiumchlorid, NaCl: Natriumchlorid, MgSO_4 : Magnesiumsulfat, CaCl_2 : Kalziumchlorid, EGTA: Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure, HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinethansulfonsäure, Na_2HPO_4 : Dinatriumhydrogenphosphat, NaHCO_3 : Natriumhydrogencarbonat, MgCl_2 : Magnesiumchlorid, CaCl_2 : Kalziumchlorid, TEACl: Tetraethylammoniumchlorid, BaCl_2 : Bariumchlorid.

Substanz	Konz. [mM]
CsCl	100
NaCl	10
MgSO_4	2
CaCl_2	0,5
EGTA	5,5
HEPES	10
150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nystatin	

pH7,4

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	136,4
Na_2HPO_4	1,1
NaHCO_3	4,17
MgCl_2	0,89
CaCl_2	0,95
TEACl	5,8
HEPES	25
BaCl_2	10
D-Glucose	11,1

pH7,4

2.2.10. Medien und Puffer

Tabelle 11: Verwendete Medien und Puffer für Bakterienkulturen (für Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen, Plasmidaufreinigung), Agarose-Gelelektrophorese, Koimmunpräzipitation, SDS-Gelelektrophorese und Western Blot. TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, NaCl: Natriumchlorid, TRIS-HCl: Tris-hydrochlorid, NaF: Natriumfluorid, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, dH_2O : destilliertes Wasser, SDS: Natriumlaurylsulfat, engl.: *sodium dodecyl sulfate*, APS: Ammoniumpersulfat, TEMED: Tetramethylethyldiamin.

Medien	Bezugsquelle	Land
CO ₂ -Independent Medium	Life Technologies	Deutschland
0,25%-ige Trypsin/EDTA-Lösung	Life Technologies	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle medium, DMEM	Life Technologies	Deutschland
Dulbecco's modified eagle's medium DMEM/HAM-F12	Life Technologies	Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline DPBS	Life Technologies	Deutschland
Opti-MEM® serumreduziertes Medium	Life Technologies	Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	Dako	Deutschland

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

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	950 ml
pH 7,0, Gesamtvolumen 1 l	
Autoklavieren	
Ampicillin 2,5 ml/l	

SOB-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
dH ₂ O auf 1 l auffüllen	
Autoklavieren, vor Benutzung frisch dazugeben:	
Filtersterilisiertes 1 M MgCl ₂	10 ml
Filtersterilisiertes 1 M MgSO ₄	10 ml

LB-Agar-Platten

Wie LB-Medium, zusätzlich:	
Agar	20 g/l
Bei 55 °C Antibiotikum dazugeben	

SOC-Medium

Filtersterilisierte 20 % Glukose oder	2 ml
Filtersterilisierte 2 M Glukose	1 ml
Autoklaviertes SOB-Medium auf ein Endvolumen von 100 ml auffüllen	

Agarose-Gelelektrophorese

50x TRIS-Acetat-EDTA-Elektrophorese-Puffer (TAE)	
Tris	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM

Koimmunpräzipitation

Lysispuffer nach Rosenthal, pH 7,6 mit HCl	
NaCl	154 mM
1 M Tris-HCl	50 mM
Natriumorthovanadat	1 mM
NaF	0,001 %
Triton-X-100	0,01 %
Natriumdeoxycholat	12 mM
EDTA	0,052 %
Aprotinin (1 : 1000), Proteaseinhibitoren (1 : 100)	
Lysispuffer für transfizierte Zellen und Cobalt Beads	
TrisHCl	150 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P40	1 %
Natriumdeoxycholat	0,5 %
40 µl/l Complete Roche Mini 25x Solution	

Waschpuffer für Agarose-Beads

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

Waschpuffer für Cobalt-Beads (pH 7,5)

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

Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

SDS-Trenngel (10 %)	
dH ₂ O	3,96 ml
1,5 M TRIS pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
30 % Acrylamid	3,33 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

SDS-Sammelgel (5 %)

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

10x SDS-Laufpuffer

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

Transferpuffer

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

10x TBS-Puffer

NaCl	1,5 M
TRIS	100 mM
700 ml dH ₂ O, pH 8,1-8,5 einstellen und auf Gesamtvolumen von 1 l auffüllen	

TBST 0,05 %

1x TBS	1 l
Tween	500 µl

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluss von Rab27a auf L-Typ-Ca_v1.3-Kanäle

Die funktionelle Interaktion zwischen Ca_v1.3 und Rab27a wurde anhand von elektrophysiologischen Messungen an L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen im heterologen System (CHO-K1) sowie an endogen exprimierten Ca_v1.3-Kanälen in Abhängigkeit von Rab27a untersucht. CHO-K1-Zellen eignen sich besonders gut für die Mikroinjektion von Plasmid-DNA. Die Modulation der Ca_v1.3-Kanal-Funktion durch Rab27a wurde durch Co-IPs und Immunzytochemie evaluiert. Die von unserer Arbeitsgruppe publizierten Daten zur Modulation von Ca_v1.3-Kanälen über die GTPase Rab27a [73], beschreiben zusätzlich die Identifikation einer Interaktionsdomäne innerhalb der Ca_v1.3-porenformenden Untereinheit, über die Rab27a Ca_v1.3-Kanälen reguliert.

3.1.1. Modulation von Ca_v1.3-Strömen durch Rab27a in CHO-K1-Zellen

Nach Mikroinjektion von Ca_v1.3, β₃ und α₂δ₁ in CHO-K1-Zellen (Abbildung 1 C-G) wurden Einwärtsströme mit charakteristischen Eigenschaften von L-Typ-Ca_v1.3-Kanalströmen gemessen: Aktivierung bei Potentialen positiver als -40mV mit einer maximalen Stromamplitude (V_{max}) bei 0 mV (Abbildung 10 A, V_{max} ; Tabelle 12). Gemessen wurde der Barium-Strom (I_{Ba}), da Ba²⁺ als Ladungsträger für Ca²⁺ fungiert. Untransfizierte CHO-K1-Zellen zeigten keine spannungsabhängige I_{Ba} (durchschnittliche maximale Stromdichte: $-0,29 \pm 0,07$ pA/pF, $n = 9$, Anhang: Abbildung 1A [3]). Spannungsabhängige I_{Ba} nach Transfektion von CHO-K1-Zellen stammen ausschließlich aus der Expression heterologer Ca_v1.3-Kanäle. Die durchschnittlichen Strom-Spannungsabhängigkeiten von Ca_v1.3-Kanalströmen in der Ab- und Anwesenheit von Rab27a wurden anhand der Boltzmann-Gleichung berechnet (Abbildung 1 C). Bei Membranpotentialen zwischen -40 mV und -10 mV zeigten Zellen, die Rab27a koexprimierten, vergrößerte relative Stromamplituden im Vergleich zu Zellen, die Rab27a nicht exprimierten. Dies zeigt sich entsprechend anhand der Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu negativeren Werten des Membranpotentials in der Anwesenheit von Rab27a.

Die Quantifizierung erfolgte anhand folgender Parameter der Boltzmann-Gleichung: dem Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0.5}$) und dem Steigungsfaktor (k_{act}). In Anwesenheit von Rab27a waren die Ströme durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle signifikant hin zu negativeren Spannungswerten verschoben ($V_{0.5}$: * $p = 0,0263$; Abbildung 10 D und Tabelle 12 A). k_{act} der Strom-Spannungskennlinien zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,3359$, Abbildung 10 E und Tabelle 12 A). Entsprechend war V_{max} bei Koexpression mit Rab27a nicht signifikant verschoben ($p = 0,6963$; Tabelle 12 A).

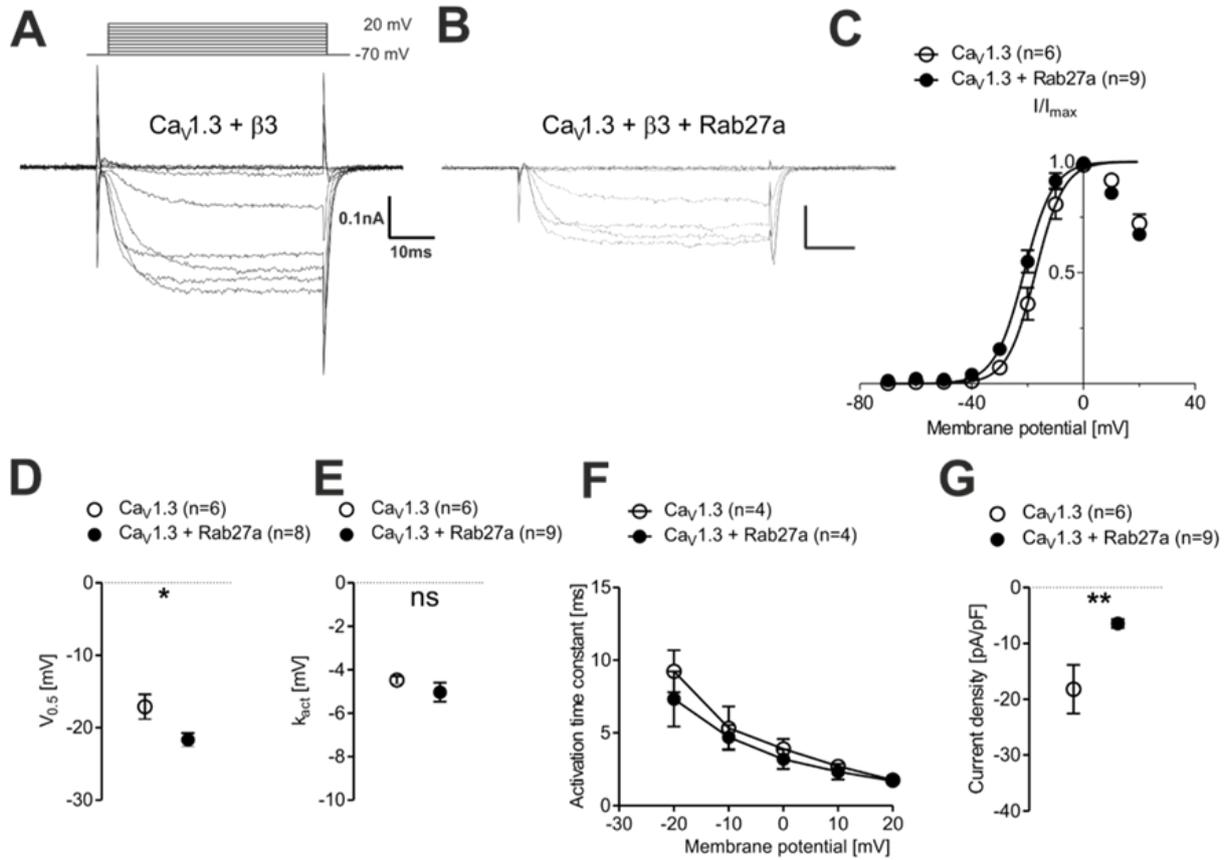


Abbildung 10: Modulation von $Ca_V1.3$ -Strömen bei Expression von Rab27a in CHO-K1-Zellen. **A, B:** Barium-Strom (I_{Ba}) einer Zelle, die $Ca_V1.3/\beta_3/\alpha_2\delta_1$ -Kanäle ohne (**A**) und mit Rab27a (**B**) exprimiert. Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV zu $+20$ mV, wurden die Zellen schrittweise depolarisiert. **C-G:** Elektrophysiologische Parameter angegeben für Zellen mit $Ca_V1.3/\beta_3/\alpha_2\delta_1$ -Kanälen ohne Rab27a (leere Kreise) und mit Rab27a (gefüllte Kreise). **C:** Spannungsabhängige Aktivierungskurven: I_{Ba} wurde jeweils - auf den Maximalstrom normiert (I/I_{max}) - gegen das Membranpotential aufgetragen und anhand der Boltzmann-Funktion angepasst; **D-E:** Vergleich der spannungsabhängigen Aktivierung von normalisiertem *steady-state*-Strom, I_{Ba} , durch heterolog exprimierte $Ca_V1.3$ -Kanäle ohne und mit Rab27a. Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0.5}$, **D**) und der Steigungsfaktor (k_{act} , **E**). **F:** Vergleich der zeitabhängigen Aktivierung von I_{Ba} mit und ohne Rab27a (Aktivierungszeitkonstante in ms). **G:** Die Stromdichte (*current density*) bei 0 mV mit und ohne Rab27a. (Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben; n gibt die Anzahl der Zellen an; p -Werte: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Die zeitabhängige Aktivierung wurde anhand der gemessenen Aktivierungszeitkonstanten (τ_{act}) des I_{Ba} bei einem Membranpotential von -20 mV bis $+20$ mV berechnet. Bei 0 mV zeigten die Ströme eine τ_{act} von $3,90 \pm 0,68$ ms in Abwesenheit von Rab27a. In Anwesenheit von Rab27a lag τ_{act} bei einem Wert von $3,02 \pm 0,76$ ms ($p = 0,4903$, Abbildung 10 F, Tabelle 12 A). I_{Ba} durch spannungsabhängige $Ca_V1.3$ -Kanäle hatten in Anwesenheit von Rab27a eine signifikant reduzierte Stromdichte bei V_{max} (** $p = 0,0064$, Abbildung 10 G, Tabelle 12 A) im Vergleich zur Stromdichte in Abwesenheit von Rab27a (Abbildung 10 G und Tabelle 1 A). τ_{act} war in Anwesenheit von Rab27a unverändert ($p = 0,4903$; Abbildung 10 F, Tabelle 12 A).

Zusammenfassend haben die Ergebnisse aus dem heterologen Expressionssystem gezeigt, dass die Interaktion mit Rab27a die Aktivität der $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle vermindert und die Spannungsabhängigkeit von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen moduliert.

3.1.2. Reduktion der Oberflächenexpression von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen durch Rab27a

Nachdem gezeigt wurde, dass $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle unter direktem Einfluss von Rab27a stehen, wurde untersucht, ob Rab27a die Lokalisation der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran verändert. Immunzytochemie und konfokale Mikroskopie an CHO-K1-Zellen (Abbildung 11 A), die mit $\text{Ca}_v1.3$ und Rab27a transfiziert waren, zeigten eine Kollokalisierung von $\text{Ca}_v1.3$, Rab27a und $\alpha_5\beta_1$ Integrin, einem Zelloberflächenmarker von CHO-K1-Zellen. Die Berechnung des PCC von $\text{Ca}_v1.3$ und Rab27a ergab eine Korrelation von $0,96 \pm 0,005$ ($n = 17$, Abbildung 11 B). Der PCC von $\text{Ca}_v1.3$ und $\alpha_5\beta_1$ Integrin war in der Anwesenheit von Rab27a um 10 % niedriger als in der Abwesenheit von Rab27a ($0,88 \pm 0,02$ ($n = 17$) vs. $0,98 \pm 0,003$ ($n = 11$) $***p = 0,0003$, Abbildung 11 B).

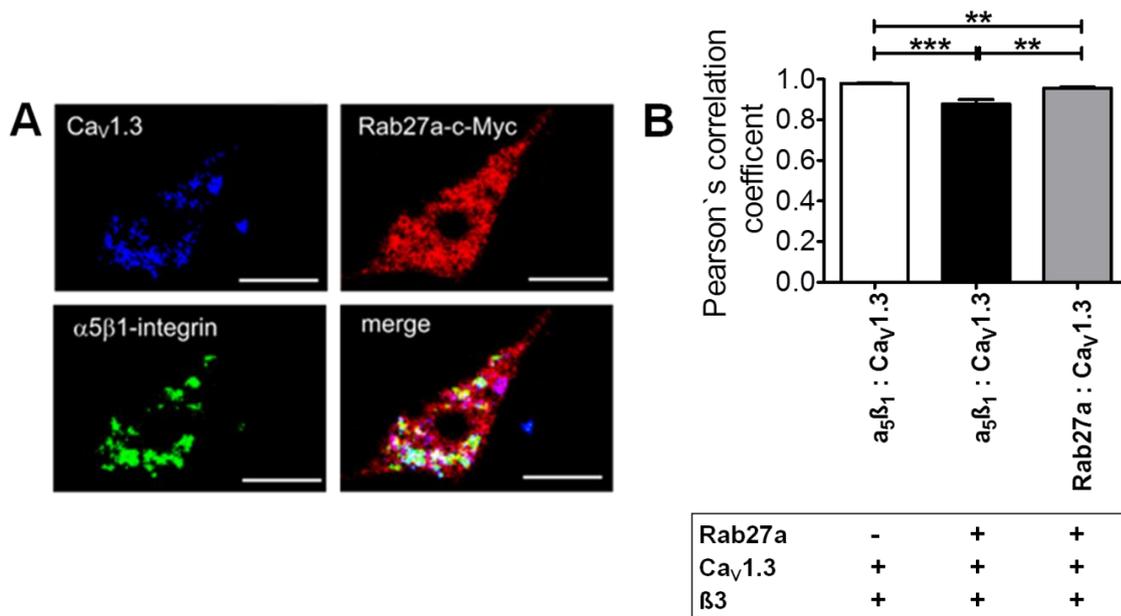


Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation von $\text{Ca}_v1.3$ in Anwesenheit von Rab27a im heterologen Expressionssystem. **A:** Konfokale Aufnahmen zeigen CHO-K1-Zellen, die mit $\text{Ca}_v1.3$, β_3 und Rab27a transfiziert wurden (Abbildung geändert nach Reichhart (2015) [3]). Immunzytochemische Färbung gegen $\text{Ca}_v1.3$ (erster Kanal: blau), c-Myc (zweiter Kanal: rot) sowie gegen den Plasmamembran-Marker, $\alpha_5\beta_1$ Integrin, (dritter Kanal: grün, vierter Kanal: Überlagerung (*merge*)). **B:** Analyse des Korrelationskoeffizienten nach *Pearson* von $\text{Ca}_v1.3$ und Rab27a. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben; n gibt die Anzahl der analysierten Zellen an; p -Werte: $**p < 0,01$; $***p < 0,001$)

Anhand der Analyse der Oberflächenexpression von heterolog exprimierten $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen konnte ein marginaler Einfluss von Rab27a auf die Lokalisation der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran von CHO-K1-Zellen nachgewiesen werden.

3.1.3. Reduktion von Ca_v1.3-Kanalströmen bei Überexpression von Rab27a

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus dem heterologen Expressionssystem wurden die Experimente an endogen exprimierten Kanälen wiederholt. Für die Überexpressionsexperimente von Rab27a wurde die humane Zelllinie ARPE-19 verwendet. ARPE-19 Zellen exprimieren endogen sowohl L-Typ-Ca_v1.3 Kanäle [5] (Abbildung 12 A, oberes Panel), als auch Rab27a (Anhang: Abbildung 1B [3]) (Abbildung 12A). Anhand von *Patch-Clamp* Messungen an ARPE-19 Zellen mit und ohne Überexpression von Rab27a wurden elektrophysiologischen Eigenschaften von Ca_v1.3-Kanalströmen (Abbildung 12) entsprechend der Analyse der Ca_v1.3-Kanalströme in den CHO-K1-Zellen analysiert.

Die Überexpression von Rab27a in ARPE-19 Zellen ließ verringerte relative Stromamplituden bei Membranpotentialen zwischen -40 mV und -10 mV erkennen (Abbildung 12A, unten). Daraus resultierte eine signifikant verschobene halbmaximale Aktivierung ($V_{0.5}$) in Richtung positiver Spannung ($***p = 0,0010$, Abbildung 12 D; Tabelle 12 B). Unter diesen Bedingungen war der Steigungsfaktor (k_{act}) signifikant kleiner ($**p = 0,0067$, Abbildung 12 E; Tabelle 12 B). Im Vergleich dazu erreichten ARPE-19 Zellen ohne Rab27a-Überexpression die $V_{0.5}$ spannungsabhängiger Ca_v1.3-Kanäle bei Membranpotentialen im negativeren Bereich (Abbildung 12 D, E), Tabelle 12 B). Zudem zeigten ARPE-19 Zellen ohne Überexpression von Rab27a einen höheren k_{act} und somit einen steileren Verlauf der Strom-Spannungskennlinien ($**p = 0,0067$, Abbildung 12 (B, E), Tabelle 12 B). Bei ARPE-19 Zellen, die Rab27a überexprimierten, war V_{max} signifikant kleiner ($*p = 0,0313$; Tabelle 12 B). τ_{act} der gemessenen I_{Ba} war bei 0 mV in Zellen, die Rab27a überexprimierten (Abbildung 12 F, Tabelle 12 B), im Vergleich zu Zellen ohne eine Rab27a-Überexpression ($p = 0,3351$, Abbildung 12 F, Tabelle 12 B), unverändert. Im Vergleich zur L-Typ-Kanal-Stromdichte in Kontrollzellen ohne Überexpression von Rab27a (Abbildung 12 C, Tabelle 12 B) konnte eine signifikant reduzierte L-Typ-Kanal-Stromdichte von spannungsabhängigen I_{Ba} (*current density*: $*p = 0,0303$, Abbildung 12 C, Tabelle 12 B) gemessen werden.

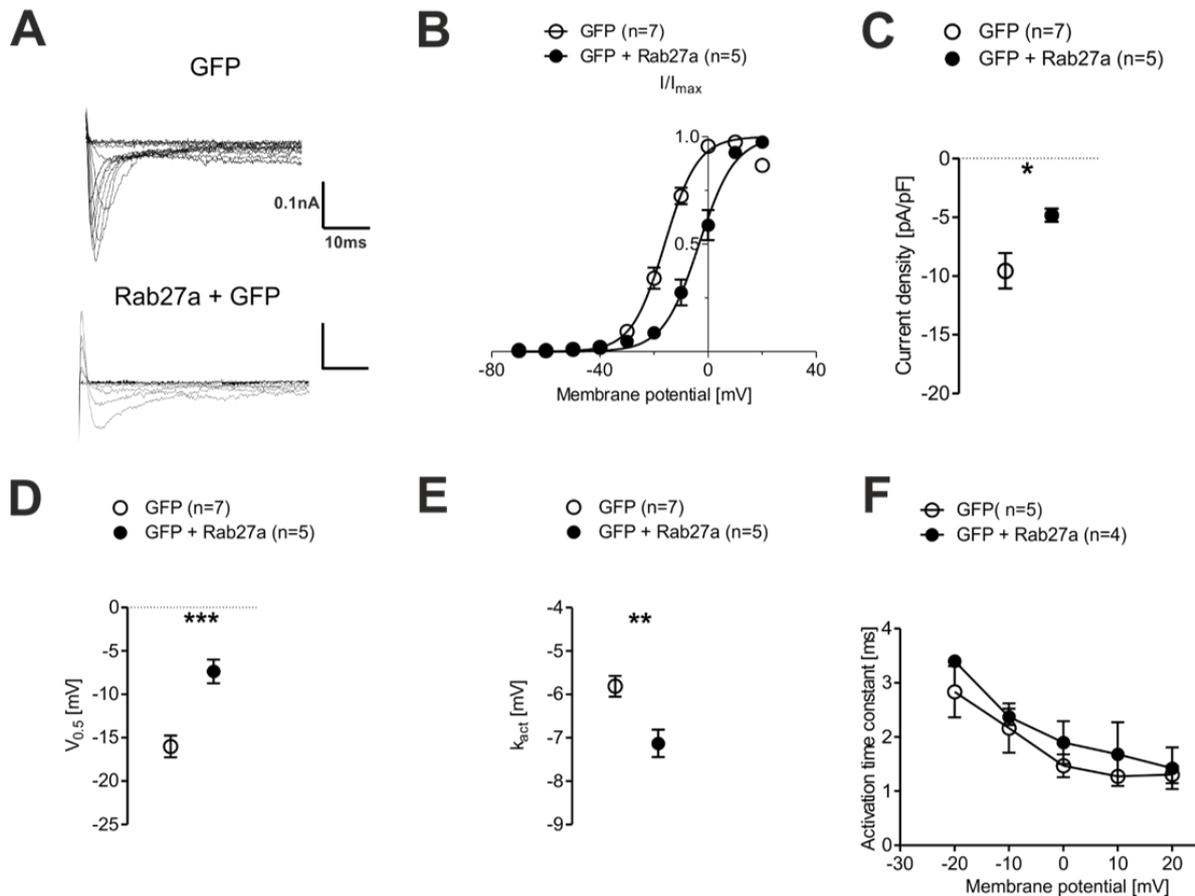


Abbildung 12: Modulation endogen exprimierter Ca_v1.3-Kanäle in ARPE-19 Zellen bei Überexpression von Rab27a. **A:** I_{Ba} einer ARPE-19 Zelle nach Injektion von GFP (grün fluoreszierendes Protein) (oberer Kanal) oder nach Injektion von GFP und Rab27a (unterer Kanal). GFP diente als Transfektionskontrolle bei Zellen ohne Rab27a-Überexpression. Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV zu +20 mV, wurden die Zellen schrittweise depolarisiert. **B-F:** Elektrophysiologische Parameter angegeben für Zellen ohne (leere Kreise) und mit Rab27a-Überexpression (gefüllte Kreise); **B:** Spannungsabhängige Aktivierungskurven: I_{Ba} wurde jeweils - auf den Maximalstrom normiert (I/I_{max}) - gegen das Membranpotential aufgetragen und anhand der Boltzmann-Funktion angepasst; **C:** Vergleich der Stromdichte (current density) bei +10 mV mit und ohne Rab27a-Überexpression. **D-E:** Vergleich der spannungsabhängigen Aktivierung von normalisiertem steady-state-Strom, I_{Ba}, durch endogene Ca_v1.3-Kanäle ohne und mit Rab27a-Überexpression (gefüllte Kreise). Potential der halbmaximalen Aktivierung (V_{0.5}, D) und der Steigungsfaktor (k_{act}, E). **F:** Vergleich der zeitabhängigen Aktivierung von endogenen I_{Ba} mit und ohne Überexpression von Rab27a. Zeitkonstanten der Aktivierungs- und Inaktivierung wurden gegen die Potentiale der elektrischen Stimulation aufgetragen. (Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben; n gibt die Anzahl der Zellen an; p-Werte: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.)

Die Daten aus der Überexpression von Rab27 in ARPE-19-Zellen haben gezeigt, dass die Aktivität von endogen exprimierten Ca_v1.3-Kanälen vermindert wird. Die Übersicht in Tabelle 12 zeigt den Vergleich aller gemessenen elektrophysiologischen Parameter in CHO-K1-Zellen (A) sowie in ARPE-19 Zellen (B).

Tabelle 12: Elektrophysiologische Parameter von heterolog (A: in CHO-K1-Zellen) und endogen (B: in ARPE-19 Zellen) exprimierten $Ca_v1.3$ -Kanälen mit und ohne Einfluss von Rab27a. $V_{0.5}$: Potential der halbmaximalen Aktivierung, k_{act} : Steigungsfaktor, V_{max} : maximale Stromamplitude, Aktivierungszeitkonstante (engl.: *activation time constant*), Stromdichte (engl.: *current density*) bei V_{max} , GFP: grün fluoreszierendes Protein. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben; n gibt die Anzahl der Zellen an; p -Werte: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

A

Transfection	$V_{0.5}$ [mV]	k_{act} [mV]	V_{max} [mV]	Activation time constant at 0 mV [ms]	Current density at V_{max} [pA/pF]
Ca_v1.3 (n=4-6)	-17.09 \pm 1.70	-4.47 \pm 0.18	-3.14 \pm 1.30	3.90 \pm 0.68	-18.20 \pm 4.37
Ca_v1.3+Rab27a (n=4-9)	-21.66 \pm 0.93 *	-5.03 \pm 0.44	-3.60 \pm 0.44	3.02 \pm 0.76	-6.43 \pm 0.79 **
p-value	0.0263	0.3359	0.6963	0.4903	0.0064

B

Transfection	$V_{0.5}$ [mV]	k_{act} [mV]	V_{max} [mV]	Activation time constant at 0 mV [ms]	Current density at V_{max} [pA/pF]
GFP (n=5-7)	-16.02 \pm 1.25	-5.81 \pm 0.24	-6.98 \pm 0.48	1.47 \pm 0.21	-9.55 \pm 1.51
GFP+Rab27a (n=5)	-7.37 \pm 1.37 ***	-7.13 \pm 0.13 **	-5.16 \pm 0.53 *	1.90 \pm 0.39	-4.83 \pm 0.55 *
p-value	0.0010	0.0067	0.0313	0.3551	0.0303

3.1.4. Physikalische Interaktion von Rab27a und Ca_v1.3

Es wurden Co-IPs durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Rab27a-abhängige Modulation der Ca_v1.3-Kanalaktivität auf einer direkten physikalischen Interaktion zwischen Ca_v1.3 und Rab27a beruht. CHO-K1-Zellen zeigten keine endogene Ca_v1.3- und Rab27a-Expression (Anhang. Abbildung 1). Die Ca_v1.3- und β_3 -Untereinheit wurden zusammen mit dem c-Myc-markierten Rab27a koexprimiert. Rab27a wurde mit Ca_v1.3 kopräzipitiert, wie die Banden bei 27 kDa (für Rab27a) und 250 kDa (für Ca_v1.3) in den WB-Analysen (Abbildung 13 A, B) zeigen.

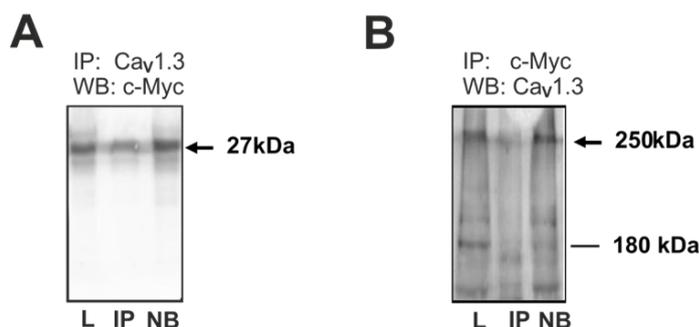


Abbildung 13: Western Blot (WB) nach Koimmunpräzipitation (Co-IP) in CHO-K1-Zellen. A-B: Zellen wurden mit Ca_v1.3, β_3 und c-Myc-markiertem Rab27a transfiziert. A: Ca_v1.3-Untereinheiten wurden präzipitiert (IP), und WBs der Präzipitate wurden für die Detektion von Rab27a gegen c-Myc gefärbt. B: Rab27a wurde mit Hilfe des anti-c-Myc Antikörpers präzipitiert, und die Präzipitate wurden gegen Ca_v1.3 gefärbt. Die Proteingröße ist in kDa angegeben (Ca_v1.3: 250 kDa, Rab27a: 27 kDa).

Die Daten aus den Co-IPs belegen die direkte Interaktion zwischen $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen und Rab27a.

3.1.5. Reduktion der VEGF-Sekretion bei Überexpression von Rab27a

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass eine erhöhte Aktivität von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in RPE-Zellen mit einer erhöhten Sekretion von VEGF korreliert [10]. Im Folgenden wurde die Sekretion von VEGF bei Überexpression von Rab27a in ARPE-19-Zellen in einem ELISA gemessen (Abbildung 14).

Die Überexpression von Rab27a führte zu einer Reduktion der VEGF-Sekretion ($100 \pm 13,83 \%$, $n = 4$ bei endogener Expression) um mehr als 50 % ($45,52 \pm 11,69\%$, $n = 4$, $*p = 0,0238$, bei Überexpression Abbildung 6). IGF-1, bFGF und Nifedipin dienten als interne Kontrollen für den ELISA. Die Applikation von bFGF (10 ng/ml) führte zu einer 1,5-mal höheren Sekretion $147,7 \pm 24,43 \%$, $n = 4$, $p = 0,1401$). Der bFGF-abhängige Anstieg der VEGF-Sekretion konnte durch die Zugabe des Dihydropyridins, Nifedipin ($10 \mu\text{M}$), vollständig gehemmt werden, sodass die Werte denen von nicht stimulierten ARPE-19 Zellen ($94,57 \pm 12,99 \%$, $n = 4$, $p = 0,784$) entsprachen. Wenn bFGF zu den Zellen gegeben wurde, die Rab27a überexprimierten, war die Sekretion von VEGF verringert und erreichte Werte, die vergleichbar waren mit Zellen, die nur Rab27a überexprimierten ($26,27 \pm 2,64 \%$, $n = 2$, $*p = 0,0239$). Die Applikation von IGF-1 (100 ng/ml) verdoppelte die VEGF-Sekretion ($185,4 \pm 45,86 \%$, $n = 4$, $p = 0,125$, Abbildung 14).

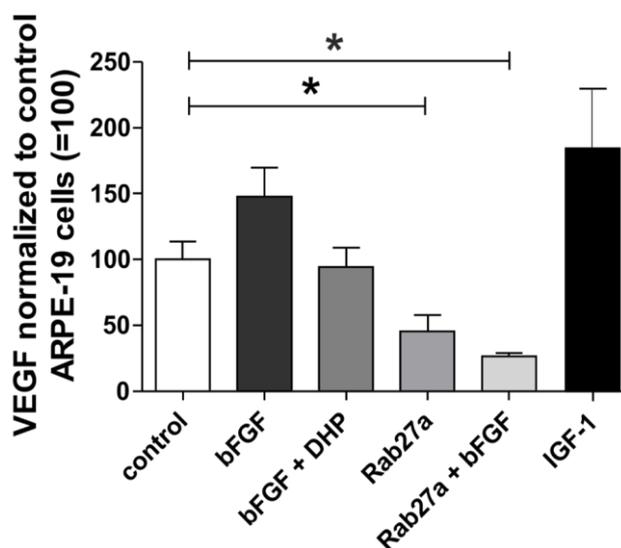


Abbildung 14: VEGF-Sekretion bei Überexpression von Rab27a in ARPE-19 Zellen.

Das Balkendiagramm zeigt die Konzentration von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) im Medium von ARPE-19 Zellen nach Stimulationen mit verschiedenen Substanzen. Alle Werte sind auf unbehandelte Zellen (control: linker weißer Balken zeigt Kontrolle) normalisiert. Die Applikation von bFGF (*basic fibroblast growth factor*, 10 ng/ml, zweiter Balken) führte zu einem Anstieg der VEGF-Sekretion ($n = 4$). Diese konnte durch eine zusätzliche Applikation des L-Typ-Kanal Blockers, Nifedipin ($10 \mu\text{M}$, dritter Balken, $n = 4$) bis auf die Werte unbehandelter Zellen gehemmt werden. Die Überexpression von Rab27a (vierter Balken) führte

zu einer Reduktion der VEGF-Sekretion von 50 % ($n = 4$). Wenn die Zellen, die Rab27a überexprimierten (fünfter Balken), mit bFGF stimuliert wurden, war die Sekretion von VEGF auf Werte der Zellen reduziert, welche nur Rab27a überexprimierten ($n = 2$). Nach Stimulation mit IGF-1 (*insulin-like growth factor*, 100 ng/ml, letzter rechter Balken) und zusätzlicher Inkubation für 4 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ war die VEGF-Konzentration im Medium fast verdoppelt ($n = 4$). (Alle Daten sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ angegeben; n gibt die Anzahl der Experimente an; p -Werte: $*p < 0,05$)

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Sekretion von VEGF durch den Einfluss von Rab27a signifikant reduziert wird.

3.2. Regulation von L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen durch Best-1

Neben Ca_v1.3-Kanälen wird auch der Ca²⁺-abhängige Cl⁻Kanal, Best-1, in der basolateralen Membran vom RPE exprimiert. Da Ca_v1.3-defiziente Mäuse einen reduzierten LP im ERG zeigten [57], welcher zugleich ein charakteristisches Merkmal bei BVMD-Patienten ist, liegt ein Zusammenhang zwischen der Regulation von Ca_v1.3-Kanälen im RPE und Best-1 nahe. Im Folgenden wurde der Einfluss von *Missense*-Mutationen aus den vier *hotspot*-Regionen im *BEST1* auf die funktionale Regulation von L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen analysiert. Zusätzlich zur Analyse der physikalischen Interaktion der Best-1-Mutanten und Ca_v1.3-Kanälen wurden elektrophysiologische Messungen in Anwesenheit der Mutanten im heterologen Expressionssystem durchgeführt. Die Lokalisation der Ca²⁺-Kanalpore in der Plasmamembran in Anwesenheit von Best-1 wurde sowohl in heterolog als auch endogen exprimierten L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen immunzytochemisch analysiert. Als heterologes Expressionssystem wurden CHO-K1-Zellen verwendet. Für die Validierung der Ergebnisse wurden endogen exprimierte Ca_v1.3-Ströme in Anwesenheit von endogen exprimiertem WT Best-1 in primären ssRPE-Zellen und humanen iPSCs genutzt.

3.2.1. Physikalische Interaktion von Ca_v1.3-Kanälen mit hBest-1-Mutanten

Als Grundlage für eine funktionelle Regulation von Ca_v1.3-Kanal über Best-1, wurde zunächst die physikalische Interaktion zwischen beiden Proteinen überprüft. Dazu wurden CHO-K1-Zellen nach der Transfektion mit Ca_v1.3, der His-gebundenen β₄-Untereinheit und WT oder mutantem hBest-1 (R218C, T6P, F80L oder F305S) lysiert und Co-IPs gegen His (Abbildung 15) und gegen Ca_v1.3 (Abbildung 16) unterzogen. Die erhaltenen drei Fraktionen L, IP und NB wurden mittels SDS-Gelelektrophorese der Proteingröße nach aufgetrennt und im WB gegen hBest-1 (Abbildung 16) oder als Kontrolle der Co-IP gegen Ca_v1.3 gegen die His-gebundene β₄-Untereinheit (Abbildung 17) gefärbt. Als Kontrollexperiment diente der WB gegen Best-1 und β₄ nach Co-IP gegen Best-1 (Anhang, Abbildung 3). Bei der Co-IP gegen die His-gebundene β₄-Untereinheit (Abbildung 15) ist bei der Transfektion mit WT hBest-1 ein starkes Signal in der IP-Fraktion bei 67 kDa sichtbar (Abbildung 15 A). Gleichzeitig ist die Bande im Lysat vergleichsweise schwach, daher ist das Signal in der Co-IP auf eine vorhandene physikalische Bindung von hBest-1 an die β₄-Untereinheit zurückzuführen. Auch die Mutante R218C zeigt eine deutliche IP-Bande bei 67 kDa (Abbildung 15 B). Die vergleichsweise schwachen Signale in der IP bei der Transfektion mit den Mutanten T6P, F80L und F305S belegen zwar eine Protein-Protein-Interaktion, zeigen aber eine unterschiedliche Effizienz der Co-IPs, wie die Quantifizierung in Abbildung 15 F zeigt. Die Co-IP-Effizienz gibt einen relativen Vergleichswert für die Auswertung der WBs an, welcher

aus dem Verhältnis von positivem IP-Signal und dem entsprechendem L-Signal berechnet wurde. Die Effizienz der Co-IP gegen β_4 war nach Transfektion mit allen Mutanten im Vergleich zum WT *hBest-1* erniedrigt. Innerhalb der Balken (Abbildung 15 F) geben die Zahlen (WT: 4/4; R218C: 4/4; T6P: 1/5; F80L: 3/3; F305S: 3/3) das Verhältnis von positiven Co-IPs und Anzahl der durchgeführten Experimente an. Bei Transfektion von R218C und F80L wie beim WT war die Co-IP zu 100 % erfolgreich. Im Gegensatz dazu fiel die Co-IP nach der Transfektion mit der Mutante T6P nur in einer von fünf durchgeführten Co-IPs gegen β_4 erfolgreich aus (Abbildung 15 C). Obwohl im Fall der Transfektion mit der Mutante F305S eine deutlich schwächere Bande in der IP erkennbar war, konnte hiermit die Interaktion dieser Mutante an die β_4 -Untereinheit bestätigt werden.

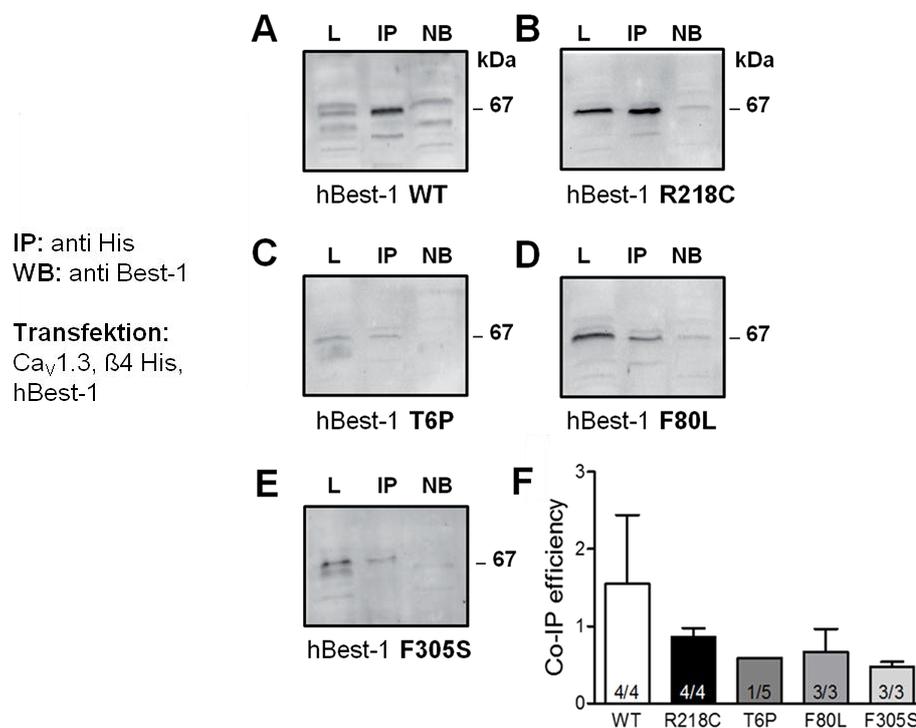


Abbildung 15: Protein-Protein Interaktion zwischen der His-getaggten β_4 -Untereinheit und *humanem* Bestrophin-1 (*hBest-1*) nach heterologer Expression in CHO-K1-Zellen. Dargestellt sind Western Blots (WBs) der Präzipitate aus der Lysat- (L-), Koimmunpräzipitation- (IP-) und der nicht gebundenen (NB-) Fraktion, die aus lysierten CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit Ca_v1.3, β_4 His und wildtypischem (WT) oder mutantern *hBest-1* (R218C, T6P, F80L, F305S) gewonnen wurden. **A-E:** WBs zeigen jeweils die Färbung gegen Best-1. Die Proteingröße ist in kDa angegeben (Best-1: 67 kDa). **F:** Das Balkendiagramm zeigt die Effizienz der erfolgreichen Co-IPs, die aus der Quantifizierung der IP-Bande im jeweiligen WB in Abhängigkeit zur entsprechenden Lysat-Bande (IP zu L) ermittelt wurde. Innerhalb der Balken sind jeweils die positiven Co-IPs gegen die Gesamtanzahl der durchgeführten Experimente angegeben. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben)

Im Folgenden wurde die tatsächliche Interaktion von mutantern *hBest-1* mit der porenformenden Untereinheit Ca_v1.3 überprüft. WT *hBest-1* und auch die Mutante R218C zeigten jeweils positives Signal in den IP-Banden, obgleich dieses Signal im Vergleich zu den IP-Banden bei Präzipitation gegen die β_4 -Untereinheit deutlich schwächer war

(Abbildung 16 A, B). Zudem war das Signal in den NB-Fractionen stärker als bei der Präzipitation der wesentlich kleineren β_4 -Untereinheit (55 kDa, Abbildung 15). So zeigte die Transfektion mit der Mutante T6P nur einer von sechs Präzipitationen ein schwach-positives Signal in der IP-Fraktion sowohl bei der Färbung des WB gegen hBest-1 als auch gegen His (Abbildung 16 C, 8C). Bei den Mutationen F80L und F305S waren IP-Banden im WB sichtbar, obgleich das Signal dieser deutlich schwächer war als in der IP-Bande bei Transfektion mit WT Best-1. (Abbildung 16 D, E).

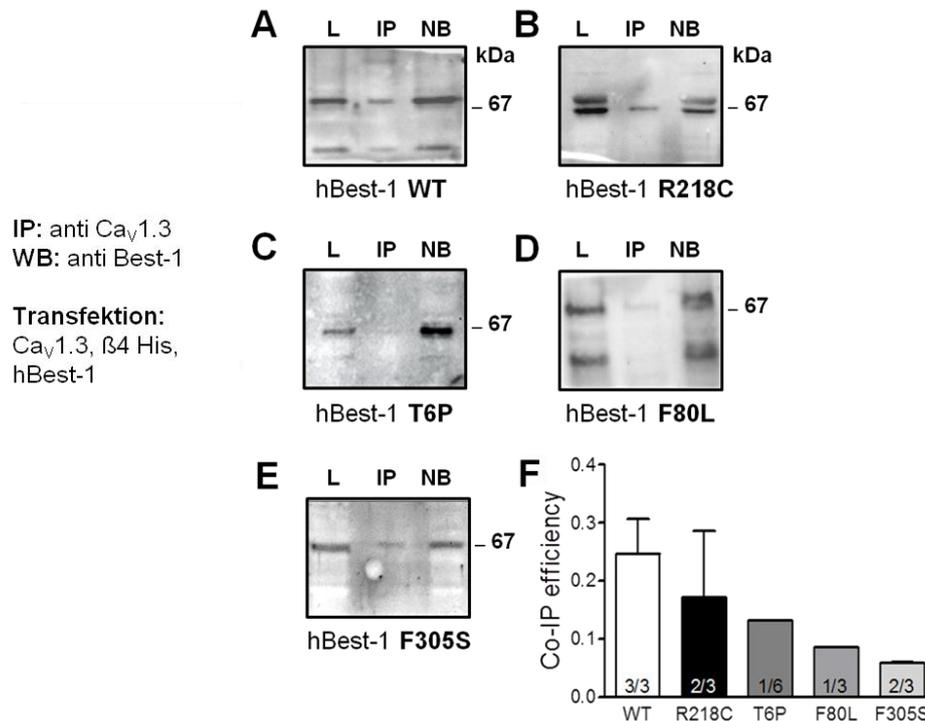


Abbildung 16: Protein-Protein Interaktion zwischen der Ca^{2+} -Kanal-Untereinheit $Ca_v1.3$ und *humanem* Bestrophin-1 (*hBest-1*) nach heterologer Expression in CHO-K1-Zellen. Dargestellt sind die Western Blots (WBs) der Präzipitate aus der Lysat- (L-), Koimmunpräzipitation- (IP-) und der nicht gebundenen (NB-) Fraktion, die aus lysierten CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit $Ca_v1.3$, β_4 His und wildtypischem (WT) oder mutanten *hBest-1* (R218C, T6P, F80L, F305S) gewonnen wurden. **A-E:** WBs zeigen jeweils die Färbung gegen Best-1. Die Proteingröße ist in kDa angegeben (*hBest-1*: 67 kDa). **F:** Quantifizierung der Co-IPs gegen $Ca_v1.3$ in CHO-K1-Zellen. Das Balkendiagramm zeigt die Effizienz der erfolgreichen Koimmunpräzipitationen (Co-IPs), die aus der Quantifizierung der IP-Bande im jeweiligen WB in Abhängigkeit zur entsprechenden Lysat-Bande ermittelt wurde. Innerhalb der Balken sind jeweils die positiven Co-IPs gegen die Gesamtanzahl der durchgeführten Experimente angegeben. (Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben)

Die Quantifizierung des IP-Signals in Abhängigkeit des jeweiligen Signals in der L-Fraktion im WB ist in Abbildung 16 F gezeigt. Die Werte der Co-IP Effizienz gegen $Ca_v1.3$ (zwischen 0 und 0,31) sind erniedrigt im Vergleich zu den Werten aus der Quantifizierung der Co-IP-Effizienz gegen die β_4 -Untereinheit (zwischen 0 und 2,5).

Trotz unterschiedlich starker IP-Banden, konnte *hBest-1* in allen durchgeführten Immunpräzipitationen gegen die β_4 - und auch gegen die $Ca_v1.3$ -Untereinheit nachgewiesen werden (Abbildung 15, 16).

Als Kontrollexperiment für die IP von $Ca_v1.3$ diente der WB gegen die β_4 -Untereinheit (Abbildung 17). Über die Detektion der β_4 -Untereinheit (55 kDa) konnte hier die IP der vergleichsweise große $Ca_v1.3$ -Untereinheit (250 kDa) bestätigt werden. Die Banden in den IP-Fractionen korrelieren mit den Ergebnissen aus den WBs gegen *hBest-1* in Abbildung 16. Im Vergleich zur Transfektion mit WT *hBest-1* oder der Mutante R218C (Abbildung 17 A, B) ist bei Transfektion der Zellen mit T6P und F80L nur ein schwaches Signal in den IP-Banden erkennbar (Abbildung 17 C, D).

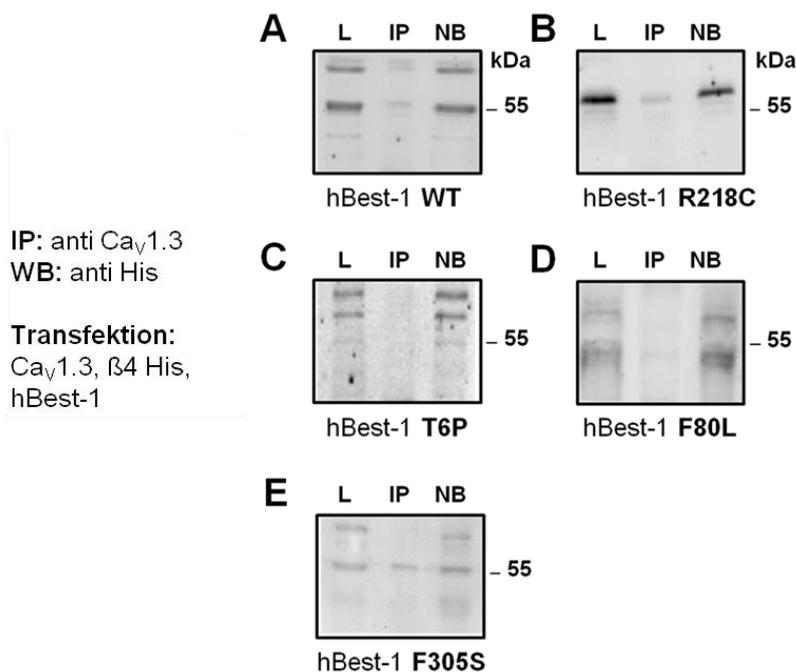


Abbildung 17: Protein-Protein Interaktion zwischen der Ca^{2+} -Kanal-Untereinheit $Ca_v1.3$ und der β_4 -Untereinheit nach heterologer Expression in CHO-K1-Zellen. Dargestellt sind die Western Blots (WBs) der Präzipitate der Lysat- (L-), Koimmunpräzipitation- (IP-) und der nicht gebundenen (NB-) Fraktion, die aus lysierten CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit $Ca_v1.3$, β_4 His und wildtypischem (WT) oder mutantern *humanen* Bestrophin-1 (*hBest-1*) (R218C, T6P, F80L, F305S) gewonnen wurden. WBs zeigen jeweils die Färbung gegen die His-gebundene β_4 -Untereinheit. Die Proteingröße ist in kDa angegeben (β_4 -His: 55 kDa)

Zusammenfassend konnte anhand der Co-IPs die physikalische Interaktion aller *hBest-1*-Mutanten an die $Ca_v1.3$ -Kanalpore nachgewiesen werden.

3.2.2. Reduktion der Stromdichte und Modulation der Stromspannungsabhängigkeit

Nachdem die Interaktion alle untersuchten *Missense*-Mutatanten von *hBest-1* mit dem Ca^{2+} -Kanal bestätigt werden konnte, wurde nun elektrophysiologisch der funktionelle Einfluss von *hBest-1* auf spannungsabhängige L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanäle untersucht. In CHO-K1-Zellen wurden I_{Ba} durch L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanäle in Anwesenheit von WT oder mutantem *hBest-1* gemessen. Mittels Mikroinjektion von Plasmid-DNA wurden die Zellen mit dem L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanal-Komplex (α_{1D} , $\alpha_2\delta_1$, und β_4) sowie WT oder mutantem *hBest-1* (R218C, T6P, F80L oder F305S) transfiziert. Für die Identifikation von transfizierten Zellen wurde zusätzlich GFP injiziert. Die in Abbildung 19 A dargestellten I_{Ba} wurden jeweils aus den *steady-state*-Messspuren - wie in Abbildung 18 gezeigt (gestrichelte Linie) - ermittelt. Das verwendete Spannungsprotokoll ist in Abbildung 19 A dargestellt.

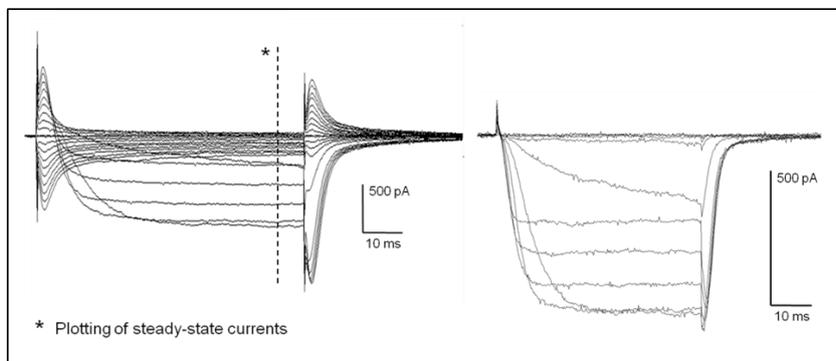


Abbildung 18: Darstellung von Bariumströmen (I_{Ba}) durch heterolog exprimierte L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanäle in *Whole-Cell*-Konfiguration, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV. Die gestrichelte Linie zeigt die *steady-state*-Ströme, die in der Abbildung rechts gezeigt sind. Diese wurden für

die Darstellung in Abbildung 10 verwendet wurden. Gezeigt ist der Einwärtsstrom durch heterolog exprimierten L-Typ- $\text{Ca}_V1.3$ -Kanälen (α_{1D} , $\alpha_2\delta_1$, β_4) nach Koexpression von wildtypischem humanen Bestrophin-1 (WT *hBest-1*) in CHO-K1-Zellen. Die Messungen wurden mit TIDA Software digitalisiert.

Ausgewählte repräsentative Messungen sind in Abbildung 19 B gezeigt. Die I_{Ba} in Anwesenheit der Mutante R218C ($n = 10$) waren vergleichbar (> 100 pA) mit I_{Ba} in Anwesenheit von WT *hBest-1* ($n = 9$). Nach Transfektion mit T6P ($n = 9$), F80L ($n = 14$) und F305S ($n = 8$) waren im Durchschnitt kleinere I_{Ba} (< 100 pA) messbar. Die Quantifizierung der I_{Ba} in Anwesenheit von WT und mutantem *hBest-1* ist in Abbildung 19 B und C sowie in Tabelle 13 dargestellt.

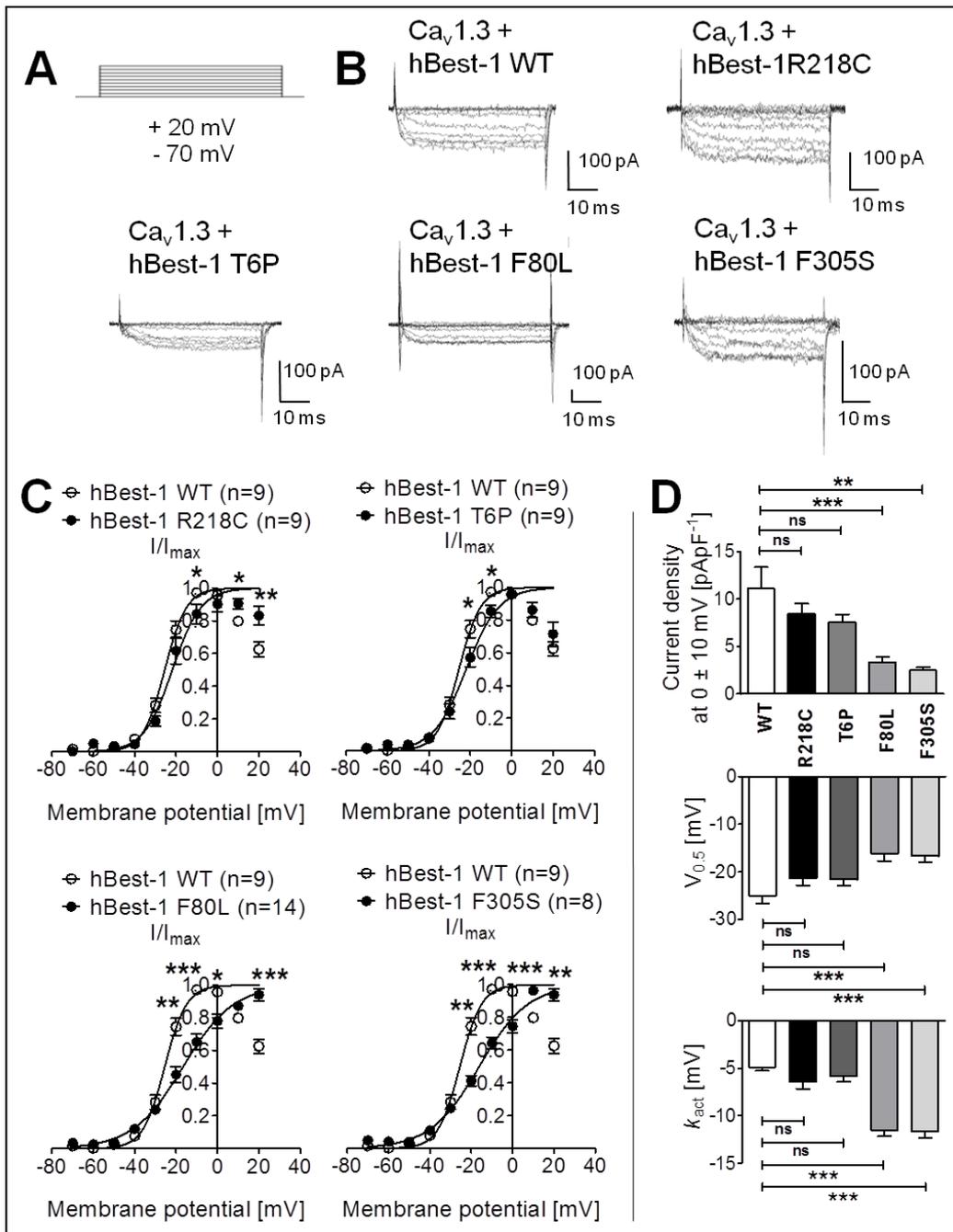


Abbildung 19: Elektrophysiologische Eigenschaften spannungsabhängiger Ba^{2+} -Ströme (I_{Ba}) durch heterolog exprimierte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle nach Ko-Transfektion mit mutantern *humanen* Bestrophin-1 (*hBest-1*) in CHO-K1-Zellen. A: Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV zu +20 mV wurden die Zellen schrittweise depolarisiert; **B:** Gemessene I_{Ba} in *Whole-Cell*-Konfiguration nach heterologer Expression von L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanälen und wildtypischem (WT) bzw. mutantern *hBest-1*; **C:** Spannungsabhängige Aktivierungskurven von L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanälen in Anwesenheit von mutantern *hBest-1* (schwarze Punkte) und WT *hBest-1* (weiße Punkte). Normalisierter I_{Ba} wurde gegen die Membranspannung aufgetragen und anhand der Boltzmann-Funktion angepasst; **D:** die Stromdichte (engl.: *current density*) gibt den Maximalstrom I_{Max} [pA] (gemessen bei einer Spannung im Bereich von 0 ± 10 mV) in Abhängigkeit von der Kapazität der Zelle [pF] in $pApF^{-1}$ an; die halbmaximale Aktivierung ($V_{0.5}$) gibt die Spannung [mV] bei halbmaximaler Aktivierung des L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanals an; der Steigungsfaktor k_{act} [mV] beschreibt die Steigung der Boltzmann-Kurven aus **C**. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben; n gibt die Anzahl der Zellen an; *p*-Werte: **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001)

Die Analyse der Strom-Spannungsabhängigkeit erfolgte mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung anhand folgender Parameter: dem Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0.5}$) und dem Steigungsfaktor (k_{act}). In Abbildung 19 C ist jeweils stets die Strom-Spannungskennlinie einer Mutante von *hBest-1* im Vergleich zu der des WT *hBest-1* dargestellt. Bei allen gemessenen I_{Ba} , die in Anwesenheit der untersuchten *hBest-1*-Mutanten gemessen wurden, zeigte sich - im Vergleich zu der Spannungsabhängigkeit von I_{Ba} in Anwesenheit vom WT *hBest-1* - eine Verschiebung der Strom-Spannungskurve zu positiven Membranpotentialen (Abbildung 19 C: schwarze Linien, Abbildung 10 D: $V_{0.5}$). In Anwesenheit der Mutanten R218C und T6P waren die relativen Stromamplituden vergleichbar zu Zellen, die mit WT *hBest-1* transfiziert wurden, bei R218C im Bereich von -10 mV bis +20 mV und bei T6P im Bereich von -20 mV bis -10 mV signifikant verringert (Abbildung 19 C). Daraus resultierte eine verschobene Spannungsabhängigkeit in Anwesenheit von R218C ($V_{0.5}$: $p = 0,0961$; Abbildung 10 D und Tabelle 13) und T6P ($V_{0.5}$: $p = 0,0984$, Abbildung 19 D und Tabelle 13) im Vergleich zu der Spannungsabhängigkeit in Anwesenheit vom WT *hBest-1* ($V_{0.5}$: Abbildung 19 D und Tabelle 13). k_{act} zeigte bei heterolog exprimiertem R218C und T6P keinen Unterschied (R218C, k_{act} : $p = 0,0687$; T6P, k_{act} : $p = 0,1630$; Abbildung 19 D und Tabelle 13) zum k_{act} in Anwesenheit vom WT *hBest-1*. Einen besonders großen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanäle hatten die beiden Mutanten F80L und F305S. In Anwesenheit dieser beiden Mutanten konnten signifikant verringerte relative Stromamplituden bei Membranpotentialen zwischen -20 mV und +20 mV ermittelt werden (Abbildung 19 C). Die Spannungsabhängigkeit der L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanäle in Anwesenheit F80L und F305S war signifikant zu positiveren Membranpotentialen verschoben (F80L, $V_{0.5}$: $***p = 0,0009$; F305S, $V_{0.5}$: $***p = 0,0010$, Abbildung 19 D und Tabelle 13). Auch k_{act} war unter diesen Bedingungen signifikant kleiner (F80L, k_{act} : $***p < 0,0001$; F305S, k_{act} : $***p < 0,0001$, Abbildung 19 D und Tabelle 13), sodass die Strom-Spannungskennlinien bei diesen Mutanten einen deutlich flacheren Verlauf im Vergleich zu Strom-Spannungskennlinien von I_{Ba} in Anwesenheit vom WT *hBest-1* zeigten (Abbildung 19C). Bei I_{Ba} in Anwesenheit vom WT *hBest-1* wurde eine Stromdichte von $-11,1 \pm 2,26 \text{ pA/pF}$ (Abbildung 19 D und Tabelle 13) bei V_{max} gemessen. Die Stromdichten in Anwesenheit von R218C (*current density*: $p = 0,3062$, Abbildung 10 D und Tabelle 2) und T6P (*current density*: $p = 0,1596$, Abbildung 19 D und Tabelle 13) waren nicht unterschiedlich. Dagegen zeigten sich signifikant reduzierte Stromdichten in Anwesenheit der Mutanten F80L (*current density*: $***p = 0,0006$, Abbildung 19 D und Tabelle 13) und F305S (*current density*: $***p = 0,0029$, Abbildung 19 D und Tabelle 13).

Tabelle 13: Elektrophysiologische Parameter heterolog exprimierter spannungsabhängiger $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle in Anwesenheit von mutantern humanen Bestrophin-1 ($h\text{Best-1}$). $V_{0.5}$: Potential der halbmaximalen Aktivierung, k_{act} : Steigungsfaktor, V_{max} : maximale Stromamplitude, Aktivierungszeitkonstante (engl.: *activation time constant*), Stromdichte (engl.: *current density*) bei V_{max} , GFP: grün fluoreszierendes Protein. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben, wobei die Werte von k_{act} jeweils den MW \pm SD zeigen; p -Werte: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Transfection: $\alpha_1D/\alpha_2\delta_1/\beta_4 +$ $h\text{Best1 X}$	$V_{0.5}$ [mV]	k_{act} [mV]	Activation time constant at 0mV [ms]	Current density at V_{max} [pA/pF]
hBest1 WT (n = 9)	$-25,1 \pm 1,53$ (n = 9)	$4,90 \pm 0,38$ (n = 11)	$1,83 \pm 0,05$ (n = 3)	$-11,1 \pm 2,26$ (n = 9)
hBest1 R218C (n = 10)	$-21,4 \pm 1,45$ (n = 10)	$6,43 \pm 0,79$ (n = 8)	$2,55 \pm 0,55$ (n = 2)	$-8,46 \pm 1,07$ (n = 9)
p-value	0,0961	0,0687	-	0,3062
hBest1 T6P (n = 9)	$-21,6 \pm 1,28$ (n = 9)	$5,86 \pm 0,57$ (n = 8)	$2,30 \pm 0,36$ (n = 3)	$-7,54 \pm 0,09$ (n = 9)
p-value	0,0984	0,1630	-	0,1596
hBest1 F80L (n = 14)	$-16,1 \pm 1,59$ (n = 14) ***	$11,5 \pm 0,64$ (n = 14) ***	$2,05 \pm 0,05$ (n = 2)	$-3,35 \pm 0,58$ (n = 14) ***
p-value	0,0009	0,0001	-	0,0006
hBest1 F305S (n = 8)	$-16,7 \pm 1,36$ (n = 8) **	$11,6 \pm 0,68$ (n = 8) ***	$2,1 \pm 0,10$ (n = 2)	$-2,49 \pm 0,33$ (n = 8) ***
p-value	0,0010	0,0001	-	0,0029

Die Analyse der zeitabhängigen Aktivierung von heterolog exprimierten L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen ergab keine signifikanten Unterschiede in Anwesenheit von mutantern $h\text{Best-1}$ zum WT (Abbildung 20). Die Aktivierungszeitkonstante, τ_{act} , wurde bei Membranpotentialen im Bereich von -20 bis +20 mV bestimmt. Bei 0 mV war τ_{act} der I_{Ba} in Anwesenheit der untersuchten Mutanten marginal größer als in Anwesenheit von WT $h\text{Best-1}$ (Abbildung 20, Tabelle 13), wobei die langsamste Aktivierung bei -20 mV in Anwesenheit von F305S (rote Linie) und T6P (grüne Linie) messbar war (Abbildung 20).

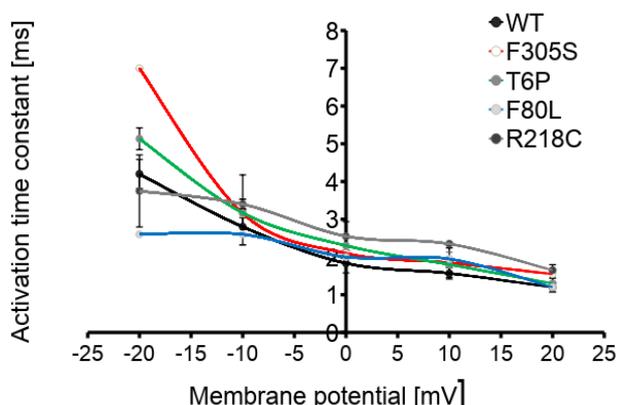


Abbildung 20: Aktivierungszeitkonstante (τ_{act}) spannungsabhängiger Ba^{2+} -Ströme in Anwesenheit von mutantern humanen Bestrophin-1 ($h\text{Best-1}$). Dargestellt sind die τ_{act} in ms (y-Achse) in Abhängigkeit vom Membranpotential in mV (x-Achse) von heterolog exprimierten $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen in Anwesenheit von wildtypischem (WT) bzw. mutantern $h\text{Best-1}$ in CHO-K1-Zellen. WT (n = 3), R218C (n = 2), T6P (n = 3), F80L (n = 2), F305S (n = 2), wobei n die Anzahl der Zellen angibt, für die die Aktivierungszeitkonstante (MW \pm SD) berechnet werden konnte.

Die Ergebnisse aus den elektrophysiologischen Messungen an heterolog exprimierten L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen in Anwesenheit von mutantern *hBest-1* haben gezeigt, dass mutantes *hBest-1* die Stromdichte von den Ca^{2+} -Kanälen reduziert. Hierbei war die Stromdichte in Anwesenheit von F80L und F305S im Vergleich zum WT *hBest-1* signifikant reduziert. In Anwesenheit dieser Mutanten war außerdem die Spannungsabhängigkeit der Ca^{2+} -Kanäle hin zu positiveren Membranpotentialen signifikant verschoben. L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanalströme in Anwesenheit von mutantern *hBest-1* zeigten keine Unterschiede in der zeitabhängigen Aktivierung zu $\text{Ca}_v1.3$ -Strömen in Anwesenheit vom WT *hBest-1*.

3.2.3. Reduzierte Oberflächenexpression von heterolog exprimierten $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen

Nachdem nun zum einen gezeigt wurde, dass der $\text{Ca}_v1.3$ -Kanalkomplex mit allen beschriebenen Mutanten von *hBest-1* physikalisch interagiert und zum anderen L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanalströme in heterolog exprimierten CHO-K1-Zellen in Anwesenheit von mutantern *hBest-1* moduliert werden, wurde die Oberflächenexpression der Ca^{2+} -Kanalpore in Anwesenheit der Mutanten analysiert. Für CHO-K1-Zellen wurde der Plasmamembran-Marker, $\alpha_5\beta_1$ Integrin, verwendet. Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von *hBest-1* sowie auch der $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit wurden Transfektionen von *hBest-1* (WT oder mutant), $\text{Ca}_v1.3$ und der β_4 -Untereinheit in CHO-K1-Zellen mittels Lipofektion durchgeführt. Anschließend erfolgten konfokale Aufnahmen von immunzytochemischen Dreifachfärbungen gegen heterolog exprimiertes *hBest-1* (weißer Kanal), $\text{Ca}_v1.3$ (roter Kanal) sowie $\alpha_5\beta_1$ Integrin (grüner Kanal), dargestellt in Abbildung 21A.

Heterolog exprimiertes WT *hBest-1* zeigte eine membranständige Proteinlokalisierung (weißer Kanal), dessen Fluoreszenzsignal sowohl mit dem der $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals (roter Kanal) als auch mit der von $\alpha_5\beta_1$ Integrin (grüner Kanal) vergleichbar war. Auch die Mutante R218C war membranständig lokalisiert und zeigte keinen negativen Effekt auf die Lokalisation der Ca^{2+} -Kanalpore. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante T6P eine überwiegend zytoplasmatische Proteinlokalisierung. Auch $\text{Ca}_v1.3$ war in Anwesenheit von T6P im intrazellulär delokalisiert. Die Mutante F80L zeigte eine unregelmäßige periphere Verteilung mit Lokalisation sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytoplasma. In Anwesenheit dieser Mutante war $\text{Ca}_v1.3$ jedoch überwiegend membranständig lokalisiert. Ein besonders auffällig diffuses Expressionsmuster zeigte die Mutante F305S. Diese Mutante war im Bereich des Zytoplasmas assoziiert, ohne eine gleichzeitige Lokalisation in der Plasmamembran zu zeigen. Die Transfektion mit F305S resultierte in einer clusterförmigen Proteinaggregation der $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit im Zytoplasma und in der Plasmamembran von CHO-K1-Zellen.

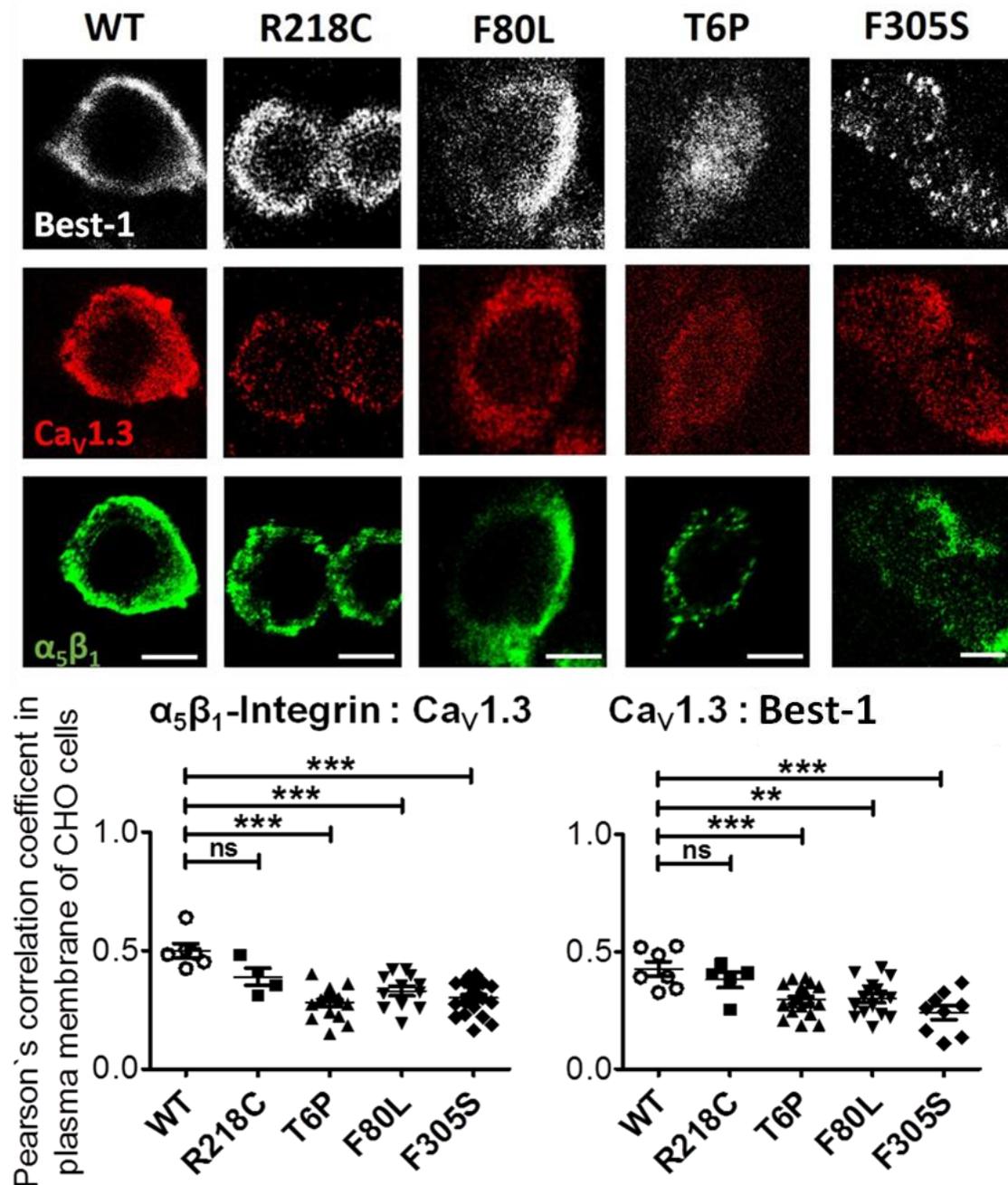


Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation von heterolog exprimiertem humanen Bestrophin-1 (*hBest-1*) und der $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit in CHO-K1-Zellen. Nach Transfektion mit wildtypischem (WT) oder mutantern *hBest-1* und der Ca^{2+} -Kanaluntereinheit, $\text{Ca}_v1.3$, wurden die Zellen immunzytochemisch gegen Best-1 (weißer Kanal) und $\text{Ca}_v1.3$ (roter Kanal) gefärbt. Die Expression von *hBest-1* und $\text{Ca}_v1.3$ wurde anhand des Plasmamembran-Markers, $\alpha_5\beta_1$ Integrin (grüner Kanal), analysiert. Die Aufnahmen wurden am konfokalen Lasermikroskop durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 5 μm ; Die Quantifizierung der konfokalen Aufnahmen erfolgte der Korrelationsanalyse nach *Pearson* (PCC): Korrelation von $\alpha_5\beta_1$ Integrin und $\text{Ca}_v1.3$ ($n = 4-23$), Korrelation von $\text{Ca}_v1.3$ und *hBest-1* ($n = 6-19$). (Alle Daten sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ angegeben; n gibt die Anzahl der analysierten Zellen an; $n. s.$ (nicht signifikant); p -Werte: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Die Quantifizierung der subzellulären Lokalisation von $\text{Ca}_v1.3$ und $h\text{Best-1}$ in der Plasmamembran nach heterologer Expression von mutantem $h\text{Best-1}$ und der Ca^{2+} -Kanalpore in CHO-K1-Zellen ist in Abbildung 21B dargestellt. Abbildung 21 B (links) zeigt die Analyse der Korrelation von $\text{Ca}_v1.3$ mit dem Plasmamembran-Marker, $\alpha_5\beta_1$ Integrin. Während die Mutante R218C die Lokalisation der $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit in der Zellmembran im Vergleich zum WT $h\text{Best-1}$ nicht signifikant verändert hat (R218C: $0,39 \pm 0,04$, $n = 4$, $p = 0,0507$ vs. WT: $0,5 \pm 0,03$, $n = 6$, Abbildung 21 B), war die Korrelation der Ca^{2+} -Kanalpore mit $\alpha_5\beta_1$ Integrin in Anwesenheit der Mutanten T6P, F80L und F305S signifikant reduziert (T6P: $0,28 \pm 0,02$, $n = 16$, $***p < 0,0001$; F80L: $0,33 \pm 0,02$, $n = 12$, $***p = 0,0003$; F305S: $0,30 \pm 0,01$, $n = 23$, $***p < 0,0001$, Abbildung 21B).

Im Vergleich zur Koexpression mit WT $h\text{Best-1}$ (WT: $0,43 \pm 0,03$, $n = 7$, Abbildung 21 (B, rechts)) war die Korrelation von $h\text{Best-1}$ mit $\text{Ca}_v1.3$ in der Plasmamembran in Anwesenheit der Mutanten T6P, F80L und F305S signifikant reduziert (T6P: $0,295 \pm 0,015$, $n = 19$, $***p = 0,0003$; F80L: $0,302 \pm 0,016$, $n = 16$, $**p = 0,0018$; F305S: $0,24 \pm 0,03$, $n = 9$, $***p = 0,00073$, Abbildung 21 (B, rechts)). Bei Koexpression von R218C war die Korrelation von $h\text{Best-1}$ und $\text{Ca}_v1.3$ nicht verändert ($0,38 \pm 0,03$, $n = 5$, $**p = 0,3596$, Abbildung 21 (B, rechts)).

Zusammenfassend zeigt die Analyse der Oberflächenexpression von heterolog exprimierten $h\text{Best-1}$ und $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen, dass die Mutanten T6P, F80L und F305S intrazellulär aggregieren und zusätzlich die Lokalisation von $\text{Ca}_v1.3$ in der Plasmamembran verhindern.

3.2.4. Dominant-negativer Effekt von mutantem $h\text{Best-1}$

Für die Validierung der Ergebnisse aus heterologer Expression von Ca^{2+} -Kanälen und $h\text{Best-1}$ wurden primäre ssRPE-Zellen verwendet, die sowohl Best-1 als auch $\text{Ca}_v1.3$ endogen exprimieren (Abbildung 22, roter und blauer Kanal). Es ist bekannt, dass BVMD autosomal-dominant vererbt wird. Um der Frage nachzugehen, ob Mutationen im *BEST1* einen dominant-negativen Effekt auf endogenes WT Best-1 zeigen und gleichzeitig die Lokalisation von $\text{Ca}_v1.3$ beeinflussen, wurden ssRPE-Zellen mit GFP-markierten $h\text{Best-1}$ -Mutanten transfiziert detektiert (grüner Kanal). Das als Kontrolle transfizierte WT $h\text{Best-1}$ konnte über die Bindung an c-Myc (grüner Kanal) identifiziert werden. Da über den Antikörper gegen Best-1 (weißer Kanal) endogenes ssBest-1 als auch transfiziertes $h\text{Best-1}$ markiert wurde, ist im roten Kanal (Best-1) jeweils die Proteinlokalisierung von endogenem und transfiziertem Best-1 zu sehen (Best-1 total).

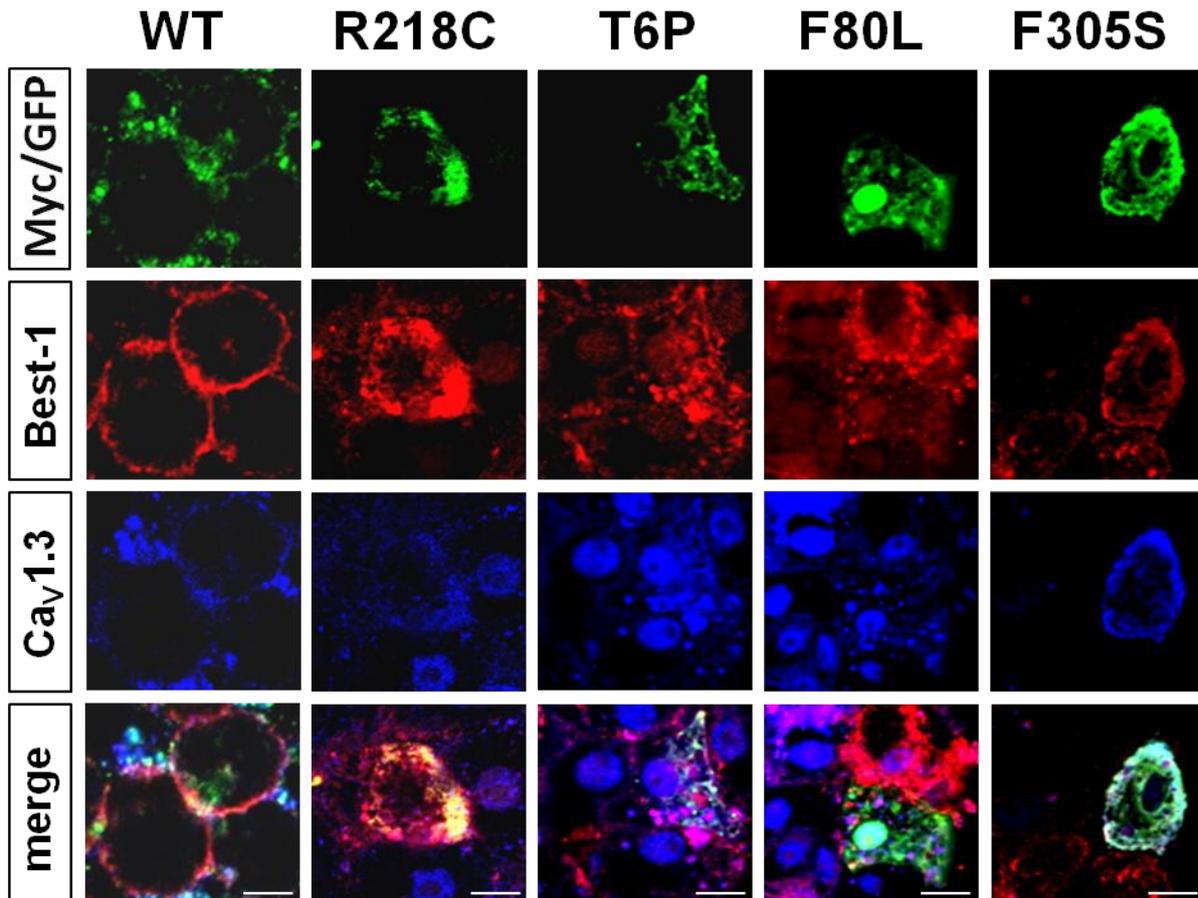


Abbildung 22: Dominant-negativer Effekt von mutantern humanen Bestrophin-1 (hBest-1) und Modulation von endogenem Ca_v1.3 in Anwesenheit von endogenem, wildtypischen (WT) Best-1 in polarisierten primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. Dargestellt sind exemplarische konfokalmikroskopische Aufnahmen von ssRPE-Zellen, die nach Transfektion mit WT c-Myc-markiertem (grüner Kanal) oder mutantern GFP- (grün fluoreszierendes Protein) markiertem hBest-1 (grüner Kanal), immunzytochemisch gegen transfiziertes hBest-1, endogenes ssBest-1 plus transfiziertes hBest-1 (roter Kanal) und Ca_v1.3 (blauer Kanal) gefärbt wurden. Der Antikörper gegen Best-1 (roter Kanal) markiert gleichzeitig das transfizierte hBest-1 und das endogene WT Best-1 (Best-1 total). Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20 μ m.

Mit c-Myc markiertes WT hBest-1 kolokalisierte sowohl mit endogenem ssBest-1 als auch mit endogenem Ca_v1.3 in der Plasmamembran von polarisierten ssRPE-Zellen (Abbildung 22). Mit WT hBest-1 transfizierte, polarisierte ssRPE-Zellen zeigten eine für RPE-Zellen charakteristische hexagonale Morphologie. An den Zell-Zell-Kontakten war eine erhöhte Proteinlokalisierung von GFP-markiertem WT hBest-1 zu sehen. Das GFP-Signal zeigte ein punktuell, leicht clusterförmiges Proteinaggregationsmuster, welches auch im Signal der Ca_v1.3-Untereinheit erkennbar war. Auch die Mutante R218C war membranständig lokalisiert und kolokalisierte sowohl mit endogenem ssBest-1 als auch mit der Ca_v1.3-Untereinheit (*merge*, Abbildung 22). Auch hier war eine hexagonale Zellmorphologie bei transfizierten Zellen erkennbar. Im polarisierten Epithel war die Mutante T6P unregelmäßig innerhalb des Zytoplasmas aggregiert und kolokalisierte hierbei teilweise mit der Ca_v1.3-

Untereinheit im Zytoplasma. F80L war überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Auffällig war das hohe GFP-Signal im Zellkern, welches nur bei Transfektion mit dieser Mutante beobachtet werden konnte. F80L bewirkte zudem eine Störung im zellulären Transport der Ca_v1.3-Untereinheit zur Zellmembran (blauer Kanal). So zeigte Ca_v1.3 eine clusterförmige Proteinaggregation innerhalb des Zytosols von RPE-Zellen. Die Mutante F305S war diffus im Bereich des Zytosols von transfizierten RPE-Zellen assoziiert. Gleichzeitig zeigte F305S membranständige Proteinlokalisierung. In Anwesenheit dieser Mutante aggregierte die Ca²⁺-Kanalpore vermehrt im Zytoplasma (blauer Kanal). Die Kolo-kalisation von endogenem und transfiziertem Best-1 in der Plasmamembran - bei Überlagerung vom grünen und roten Kanal - ist in Anwesenheit von WT und R218C größer (gelbes Signal, *merge*, Abbildung 22) als in Anwesenheit von der anderen Mutanten.

Zusammenfassend zeigen die Daten aus primären ssRPE Zellen, dass alle *hBest-1*-Mutanten einen negativen Effekt sowohl auf den zellulären Transport des endogenen WT *ssBest-1* als auch der Ca_v1.3-Kanalpore haben.

3.2.5. Delokalisation von T6P, F80L und F305S im Zytoplasma polarisierter RPE-Zellen

Im Folgenden wurden die vorherigen Ergebnisse zusätzlich unter Verwendung eines Plasmamembran-Markers validiert. Für RPE-Zellen wurde β -Catenin verwendet. Mit dem Ziel, die subzelluläre Lokalisation von Best-1- Mutanten konfokal genauer zu bestimmen, wurden zusätzlich vertikale optische Schnitte (*Z-stacks*) in konfokalen Aufnahmen von transfizierten ssRPE-Zellen analysiert. In Abbildung 23 sind *Z-stacks* (8 optische Schnitte mit einer Dicke von 0,73 μ m) von polarisierten ssRPE-Zellen dargestellt. GFP-markiertes *hBest-1* (WT *hBest-1* und die Mutanten R218C, T6P, F80L und F305S) (grüner Kanal), Best-1 total (endogenes und transfiziertes Best-1) (roter Kanal) und β -Catenin (blauer Kanal) wurden analysiert. Die unterbrochene weiße Linie (Abbildung 23) zeigt die Ebene, bei welcher die vertikalen optischen Schnitte durchgeführt wurden. Die polare Organisation der RPE-Zellen ist jeweils in der XZ-Ansicht angegeben (Abbildung 23).

Die Transfektion mit WT *hBest-1* sowie der Mutante R218C zeigte eine membranständige Proteinlokalisierung von heterolog sowie endogen exprimiertem Best-1 total. In der vertikalen Ansicht (XZ) war eine Kolo-kalisation (*merge*, gelbes Signal) von GFP und β -Catenin erkennbar. Die Mutante T6P wies in diesem Experiment eine diffuse unregelmäßige, teilweise clusterförmige periphere Proteinlokalisierung auf, die besonders in der Nähe des Zellkerns erkennbar war. Eine Überlagerung von GFP- und β -Catenin-Signal war nicht messbar (XZ-Ebene). Die Mutante F80L war im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert, wobei zusätzlich prominentes GFP-Signal im Zellkern detektiert wurde. Die Überlagerung von GFP-markiertem F80L mit β -Catenin zeigte keine Kolo-kalisation. Heterolog exprimiertes F305S zeigte in polarisierten RPE-Zellen wiederholt eine geclusterte Proteinlokalisierung mit geringer

Kolokalisation in der Plasmamembran. Auch die Lokalisation von β -Catenin bei Transfektion mit den Mutanten F80L und F305S zeigte deutliche Unterschiede. So wiesen mit diesen Mutanten transfizierte RPE-Zellen weniger β -Catenin-Signal in der Zellmembran auf als untransfizierte Zellen. Dadurch war die Plasmamembran bei aneinandergrenzenden transfizierten Zellen weniger deutlich erkennbar. Die Mutationen T6P und F305S waren apikal assoziiert, wohingegen R218C und F80L - analog zum WT *hBest-1* - basolateral lokalisiert waren (XZ-Ebenen: grüner Kanal und *merge* (gelbes Signal), Abbildung 23).

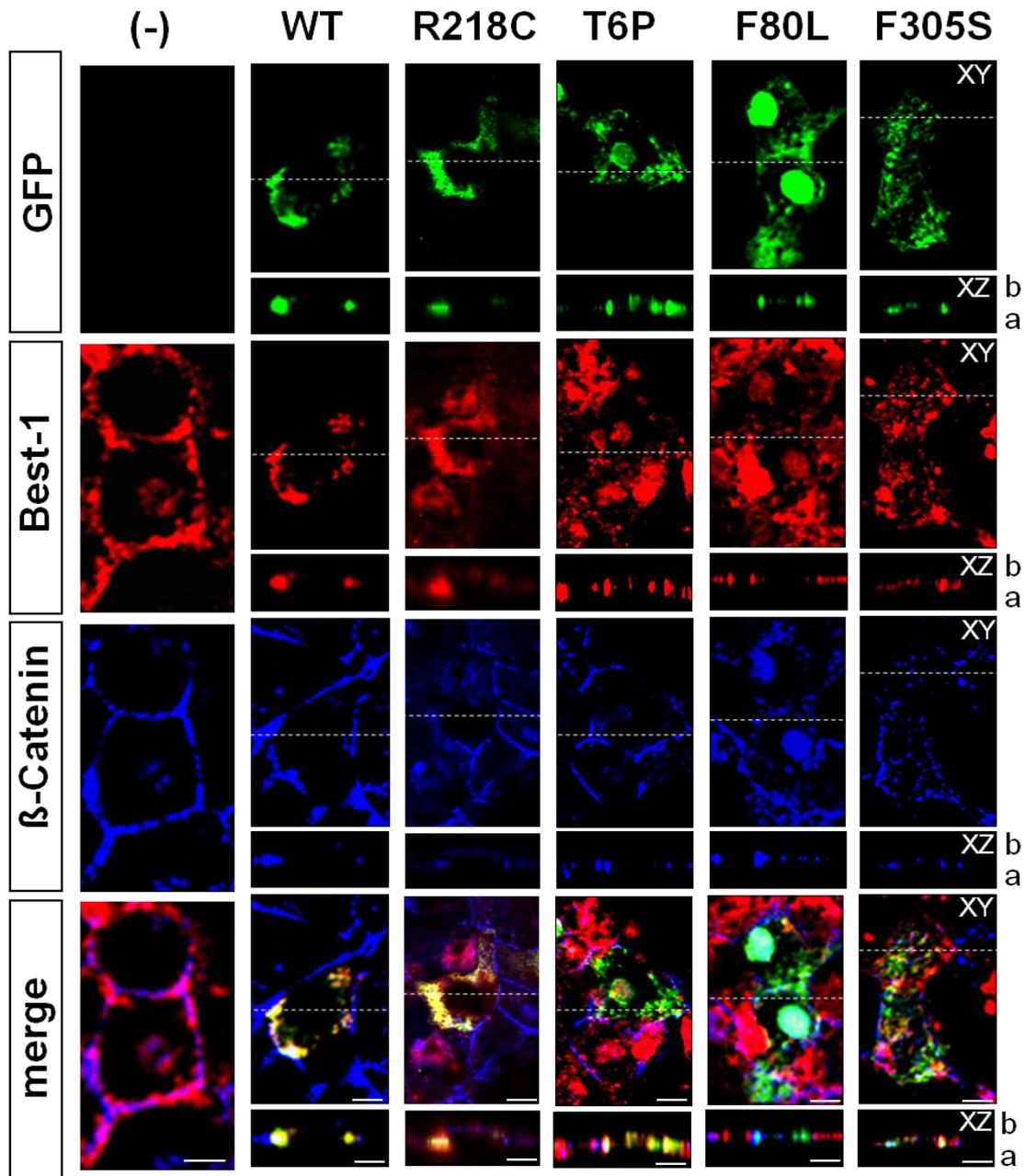


Abbildung 23: Subzelluläre Lokalisation von heterolog und endogen exprimiertem Bestrophin-1 (Best-1) in polarisierten primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. Dargestellt sind exemplarische konfokalmikroskopische Aufnahmen von ssRPE-Zellen, die nach Transfektion mit wildtypischem (WT) oder mutantern GFP- (grün fluoreszierendes Protein) markiertem *hBest-1*, immunzytochemisch gegen transfiziertes *hBest-1* (grüner Kanal), endogenes ssBest-1 (roter Kanal) und den Plasmamembran-Marker, β -Catenin (blauer Kanal) gefärbt wurden. Der Antikörper gegen Best-1 (roter Kanal) markiert gleichzeitig das transfizierte *hBest-1* und das endogene WT ssBest-1 (Best-1 total). Die Überlagerung der drei Kanäle ist im letzten Kanal (*merge*) gezeigt. Die erste Spalte (links) zeigt die endogene Expression von ssBest-1 in nicht transfizierten ssRPE-Zellen. Transfizierte ssRPE-Zellen sind jeweils in XY- und XZ- Ebenen aus repräsentativen Z-stacks dargestellt (jeweils 8 optische Schnitte mit einer Dicke von $0,73 \mu\text{m}$). Die gestrichelte Linie in den XZ-Ansichten gibt jeweils die Ebene an, aus der die optischen vertikalen Schnitte (XZ) ermittelt wurden. Bei der XZ-Ansicht ist zusätzlich jeweils die apikale (a) und basolaterale (b) Orientierung der polarisierten RPE-Zellen dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils $20 \mu\text{m}$.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von *hBest-1*-Mutanten in polarisierten ssRPE Zellen anhand des Plasmamembran-Markers, β -Catenin, hat die Beobachtungen aus Abbildung 22 bestätigt: Mutantes *hBest-1*, insbesondere T6P, F80L und F305S, zeigten eine reduzierte Oberflächenexpression und aggregierten innerhalb des Zytoplasmas. Zusätzlich hatten die Mutanten einen negativen Einfluss auf den zellulären Transport von endogenem WT ssBest-1 zur Zellmembran.

3.2.6. Apikale Lokalisation von T6P und F305S

Mit dem Ziel, die polare Orientierung der *hBest-1*-Mutanten in RPE-Zellen genauer zu untersuchen, wurden konfokale *Z-stacks* aus Abbildung 23 auf apikale und basolaterale subzelluläre Lokalisation von transfiziertem GFP-markiertem *hBest-1* analysiert und statistisch ausgewertet. Dabei wurde die basolaterale Lokalisation als *score 1* und die apikale als *score 2* definiert (Abbildung 24). Die Mutante R218C zeigte keine Unterschiede zum WT und wies eine deutlich basolaterale Lokalisation auf (R218C: $1,21 \pm 0,10$, $n = 6$, $p = 0,3605$ vs. WT: $1,08 \pm 0,08$, $n = 6$, Abbildung 24). Die Mutationen T6P und F305S zeigten eine apikale Lokalisation (T6P: $1,92 \pm 0,05$, $n = 6$, $***p < 0,001$; F305S: $1,71 \pm 0,10$, $n = 6$, $***p = 0,0007$, Abbildung 24), während die Mutante F80L sich signifikant in der Lokalisation vom WT *hBest-1* unterschied, aber eher basolateral als apikal assoziiert war (F80L: $1,46 \pm 0,04$, $n = 6$, $**p = 0,0024$, Abbildung 24).

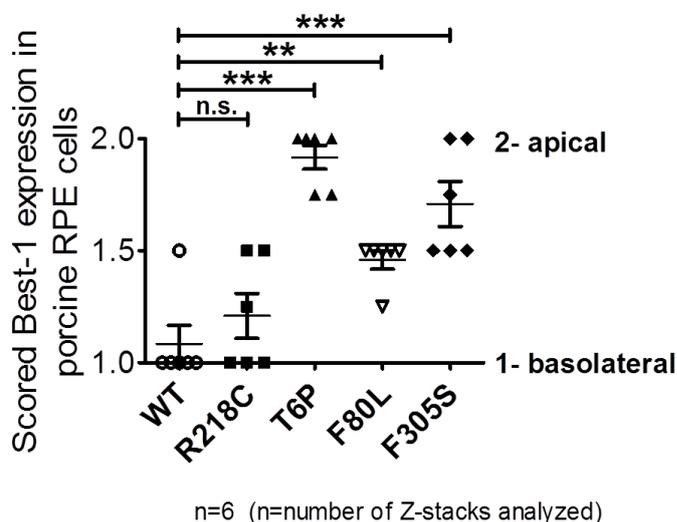


Abbildung 24: Polarität heterolog exprimierter Bestophin-1-Mutationen in polarisierten primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. Ausgewertet wurde die Expression von *hBest-1* anhand ihrer apikalen oder basolateralen Orientierung in jeweils $n = 6$ *Z-stacks*, wobei basolateral als *score 1* als und apikal als *score 2* definiert wurde. Die Analyse erfolgte verblindet aus den konfokalen Aufnahmen, die exemplarisch in Abbildung 14 gezeigt sind. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben; n gibt die Anzahl der *Z-stacks* an; n. s. (nicht signifikant); p -Werte: $**p < 0,01$; $***p < 0,001$)

Die Analyse zeigte, dass T6P und F305S in RPE-Zellen apikal assoziiert sind. Die qualitativen Beobachtungen aus den konfokalen Aufnahmen in Abbildung 23 konnten bestätigt werden.

3.2.7. Reduzierte Oberflächenexpression von $Ca_v1.3$ in polarisierten RPE-Zellen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass der zelluläre Transport der $Ca_v1.3$ -Untereinheit in Anwesenheit von *hBest-1* Mutationen gestört war, wurde nun die Proteinlokalisierung der

Ca²⁺-Kanalpore in der Zellmembran anhand des Plasmamembran-Markers, β -Catenin (blauer Kanal, Abbildung 25), genauer analysiert. Dabei wurde untersucht, ob die Lokalisation von Ca_v1.3 in der Plasmamembran in Anwesenheit von mutantern und endogenem hBest-1 reduziert ist. Dazu wurde GFP-markiertes hBest-1 (grüner Kanal), Ca_v1.3 (roter Kanal) und β -Catenin (blauer Kanal) analysiert. (Abbildung 25).

Die Transfektion mit WT hBest-1 sowie der Mutante R218C zeigte eine membranständige Proteinlokalisierung von transfiziertem hBest-1. In der Überlagerung (*merge*, Abbildung 25) war in beiden Fällen eine Kolokalisation von GFP, Ca_v1.3 und β -Catenin im Bereich der Plasmamembran zu erkennen. T6P zeigte erneut eine auffällig diffuse Lokalisation im Zytoplasma. Besonders auffällig war hier, dass Ca_v1.3 im Bereich des Zellkerns detektiert werden konnte, wobei keine Kolokalisation bei Überlagerung mit dem grünen Kanal (T6P-GFP) detektierbar war. Die Mutante F80L war auch hier im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert, wobei gleichzeitig eine erhöhte Proteinaggregation im Zellkern sichtbar war. In Anwesenheit dieser Mutante zeigten sich clusterförmige Proteinaggregate innerhalb des Zytoplasmas im roten Kanal, obgleich keine Kolokalisation von grünem (F80L-GFP) und rotem Signal (Ca_v1.3) im Zytoplasma erkennbar war. Trotz schwacher, aber vorhandener Proteinlokalisierung von F80L in der Plasmamembran, konnte keine Kolokalisation von rotem und grünem Signal in der Plasmamembran festgestellt werden. Eine besonders auffällige clusterförmige Proteinlokalisierung - ausschließlich im Zytosol polarisierter ssRPE-Zellen - zeigte die Mutante F305S. Dieses Muster war mit dem Signal im roten Kanal (Ca_v1.3) vergleichbar. Hierbei konnte eine Kolokalisation von grünem (F305S-GFP) und rotem Signal (Ca_v1.3) innerhalb des Zytoplasmas detektiert werden (*merge*, Abbildung 25).

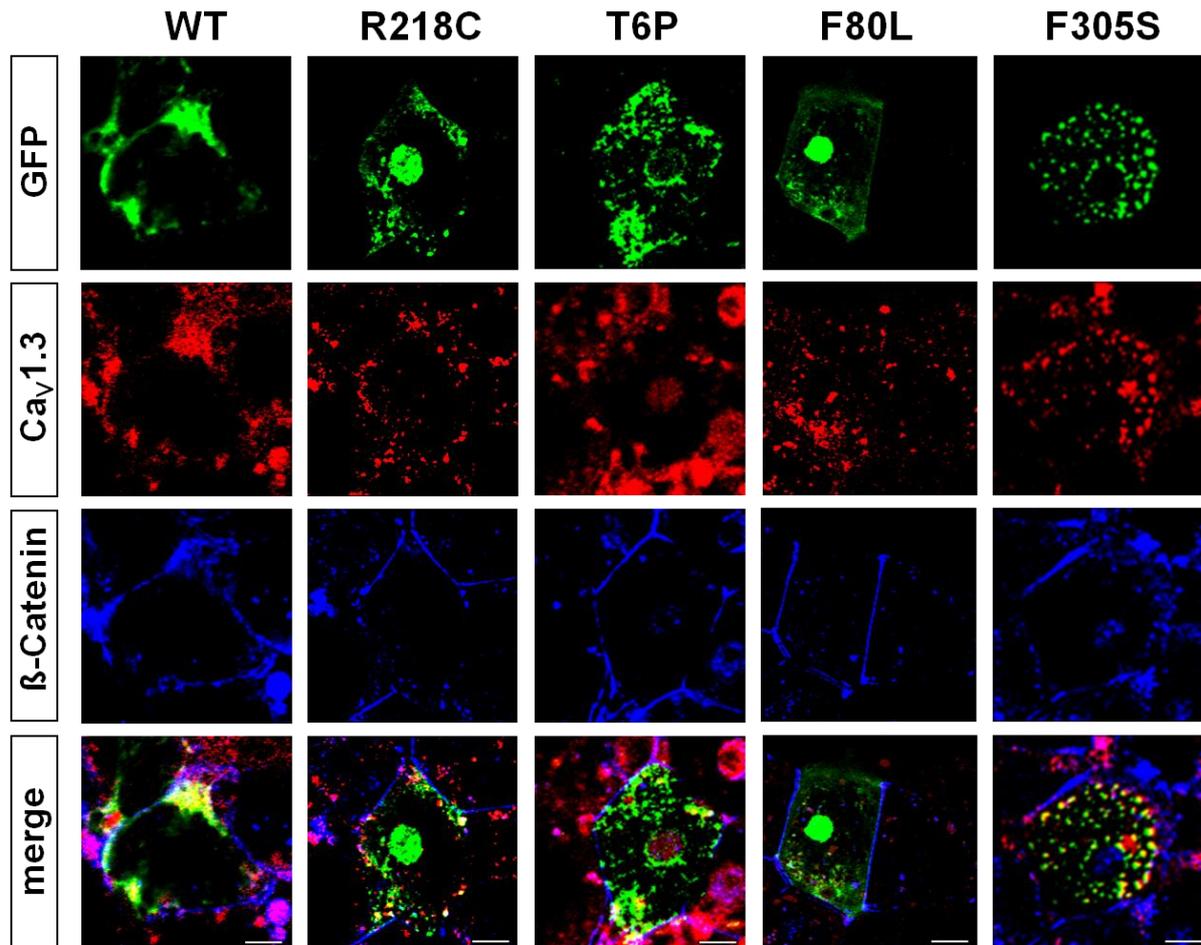


Abbildung 25: Subzelluläre Lokalisation von endogenem $Ca_V1.3$ in Anwesenheit von heterolog exprimiertem humanen Best-1 ($hBest-1$) in polarisierten primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. Dargestellt sind exemplarische konfokalmikroskopische Aufnahmen von ssRPE-Zellen, die nach Transfektion mit wildtypischem (WT) oder mutantern GFP- (grün fluoreszierendes Protein) markierten $hBest-1$, immunzytochemisch gegen transfiziertes $hBest-1$ (grüner Kanal), $Ca_V1.3$ (roter Kanal) und den Plasmamembran-Marker, β -Catenin (blauer Kanal) gefärbt wurden. Die Überlagerung der drei Kanäle ist im letzten Kanal (merge) gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils $20 \mu m$.

Die membranständige Lokalisation der porenformenden $Ca_V1.3$ -Untereinheit und Best-1 wurde anhand der konfokalen Aufnahmen aus Abbildung 23 und Abbildung 25 mit Hilfe des PCC und der Pixelanalyse über *edge detection* quantifiziert. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von transfiziertem mutantern und endogenem WT $hBest-1$ sollte hierbei der Einfluss auf endogene $Ca_V1.3$ -Kanäle in polarisierten ssRPE-Zellen untersucht werden. Anhand des PCC wurde die Korrelation von Best-1 (Best-1 total: endogenes WT ssBest-1 und transfiziertes GFP-markiertes $hBest-1$) und dem Plasmamembran-Marker, β -Catenin, ermittelt (Abbildung 26). Die Proteinexpression von transfiziertem $hBest-1$ (schwarze Balken) korrelierte mit der Proteinexpression von Best-1 total (weiße Balken). Während die Korrelation von Best-1 total mit β -Catenin bei Transfektion mit der Mutante R218C bei einem Wert von $0,55 \pm 0,06$ (** $p = 0,0047$, $n = 6$) lag, waren die Unterschiede zur Korrelation bei

RPE-Zellen, die mit dem WT Best-1 ($0,77 \pm 0,04$, $n = 10$) transfiziert wurden, nach Transfektion mit T6P ($0,31 \pm 0,03$, $n = 6$, $***p < 0,0001$), F80L ($0,44 \pm 0,03$, $n = 7$, $***p < 0,0001$) sowie F305S ($0,50 \pm 0,05$, $n = 6$, $***p = 0,0001$) signifikant größer.

Bei dem Vergleich der Korrelation von GFP-markiertem transfizierten *hBest-1* mit β -Catenin ($0,68 \pm 0,04$, $n = 10$) ergab die PCC-Analyse bei allen Mutanten im Vergleich zur Transfektion mit WT *hBest-1* eine signifikant reduzierte Korrelation von transfiziertem Best-1 mit β -Catenin (schwarze Balken): (R218C-GFP: $0,50 \pm 0,05$, $n = 6$, $*p = 0,0133$); T6P-GFP: $0,21 \pm 0,04$, $n = 6$, $***p < 0,0001$); F80L-GFP: $0,34 \pm 0,05$, $n = 7$, $***p < 0,0001$); F305S-GFP: $0,33 \pm 0,03$, $n = 6$, $***p < 0,0001$).

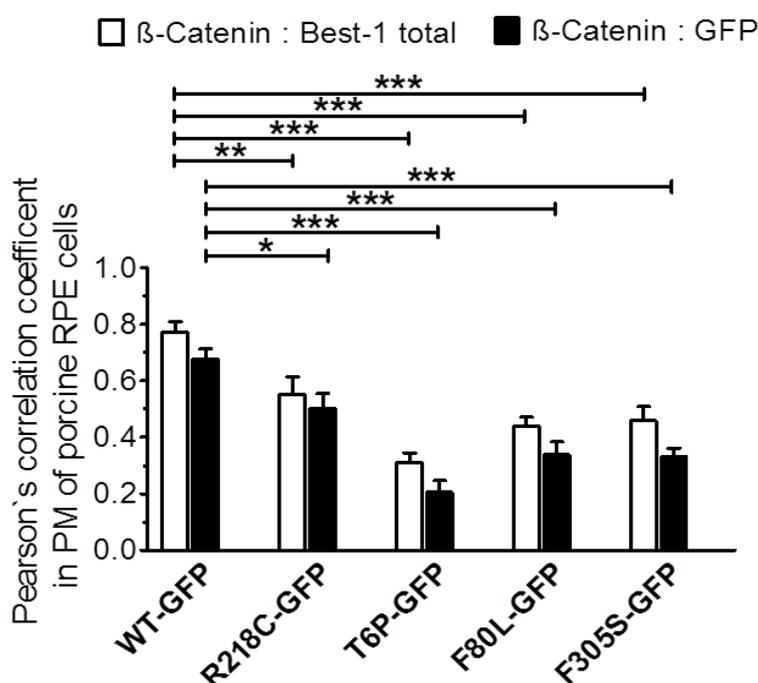


Abbildung 26: Korrelation von Bestrophin-1 (Best-1) (endogen und heterolog exprimiert) mit der Plasmamembran in polarisierten primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten aus der Analyse von Einzelzellen nach *Pearson* (PCC). Mit Hilfe der ImageJ Software wurde die Analyse der Korrelation von Best-1 total (Expression von endogenem und heterolog exprimiertem humanen Best-1) (weiße Balken, $n = 6-10$ Zellen) bzw. GFP (grün fluoreszierendes Protein) (heterolog exprimiertes humanes Best-1,

schwarze Balken, $n = 6-10$ Zellen) mit dem Plasmamembran-Marker, β -Catenin, ermittelt. Der PCC wurde im Bereich von 0 bis 1 angegeben, wobei 0 keine und 1 eine vollständige Korrelation in der Plasmamembran angibt. Die Analyse umfasst die Ergebnisse aus $n = 3$ Transfektionen pro Wildtyp (WT) und Mutante. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben; n gibt die Anzahl der Zellen an; p -Werte: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$)

Mit Hilfe der *edge detection* wurde die Pixelanzahl von $Ca_v1.3$ (weiße Balken) und GFP-positivem Signal (schwarze Balken) in der Plasmamembran in Abhängigkeit zur Pixelanzahl in der gesamten Zelle berechnet und für den Vergleich mit WT *hBest-1* als prozentualer Wert angegeben (Abbildung 27). Hierbei war die Mutante R218C (R218C-GFP: $77,00 \pm 2,79$ %, $n = 6$, $p = 0,5247$) im Vergleich zu WT *hBest-1* (WT-GFP: $80,63 \pm 4,51$ %, $n = 7$) nicht reduziert. Signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen bei den Mutanten T6P (T6P-GFP: $26,23 \pm 3,18$ %, $n = 6$, $***p < 0,0001$) und F80L (F80L-GFP: $34,73 \pm 4,00$ %, $n = 6$, $***p < 0,0001$), wobei ein besonders großer Unterschied bei der Mutante F305S (F305S-GFP: $7,93 \pm 1,10$ %, $n = 6$, $***p < 0,0001$) gemessen wurde.

Zusätzlich war auch die relative Pixelanzahl in den immunzytochemischen Färbungen für $Ca_v1.3$ bei den Mutanten R218C ($Ca_v1.3$: $75,25 \pm 3,39$ %, $n = 6$, $*p = 0,025$) und F80L ($Ca_v1.3$: $63,24 \pm 7,36$ %, $n = 6$, $**p = 0,0094$) im Vergleich zu ssRPE-Zellen, die mit WT hBest-1 ($Ca_v1.3$: $86,60 \pm 2,84$ %, $n = 7$) transfiziert waren, signifikant reduziert (Abbildung 27, weißer Balken). Eine besonders große Abweichung zur Transfektion mit WT zeigte die $Ca_v1.3$ -Untereinheit bei Transfektion mit den Mutanten T6P ($Ca_v1.3$: $41,48 \pm 5,89$ %, $n = 6$, $***p < 0,0001$) und F305S ($Ca_v1.3$: $38,18 \pm 5,36$ %, $n = 6$, $***p < 0,0001$).

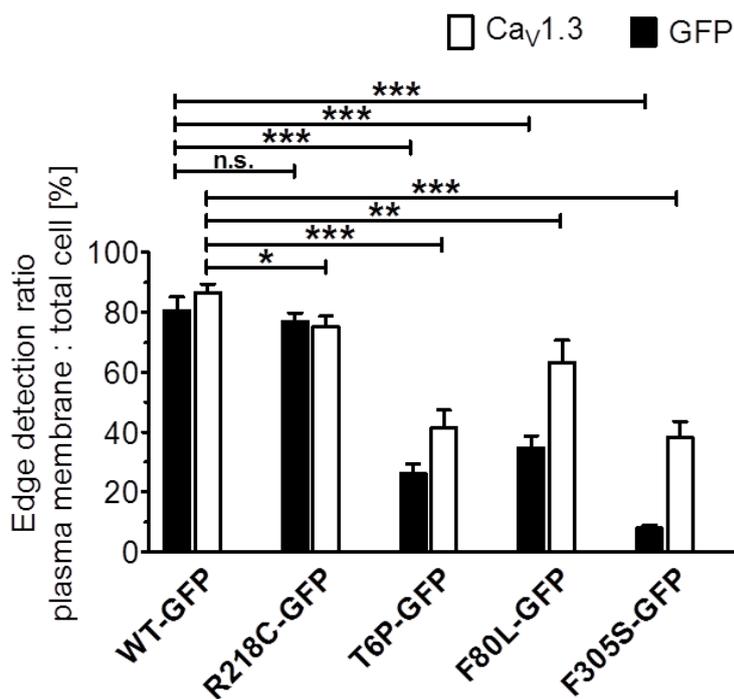


Abbildung 27: Kolokalisation von endogenem $Ca_v1.3$ mit transfiziertem wildtypischen (WT) bzw. mutantern *humanen* Bestrophin-1 (*hBest-1*) in polarisierten primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. Dargestellt ist die Analyse aus Einzelzellen nach der *edge detection* – Methode, wobei jeweils für die $Ca_v1.3$ - (weiße Balken, $n = 6-7$) sowie für die Expression von GFP (grün fluoreszierendes Protein) (schwarze Balken, $n = 6-7$) die prozentualen Werte aus dem Verhältnis der Pixelmenge in der Plasmamembran und der entsprechenden Pixelanzahl in der

gesamten Zelle berechnet wurden. Die Analyse umfasst die Ergebnisse aus jeweils $n = 3$ Transfektionen pro WT bzw. mutantern *hBest-1*. (Alle Daten sind als $MW \pm SEM$ angegeben; n gibt die Anzahl der Zellen an; n. s. (nicht signifikant); p -Werte: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$)

Zusammenfassend zeigt die Analyse in polarisierten ssRPE-Zellen, dass alle *hBest-1*-Mutanten die Oberflächenexpression der $Ca_v1.3$ -Kanäle stören. Alle Ergebnisse aus der Analyse der Oberflächenexpression in polarisierten ssRPE-Zellen sowie der elektrophysiologischen Messungen an heterolog exprimierten L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanälen in CHO-K1-Zellen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der elektrophysiologischen Analyse von heterolog exprimierten L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen (**oben**) sowie der Oberflächenexpression in der Plasmamembran (engl.: *surface expression*) von $\text{Ca}_v1.3$ und mutantem humanen Bestrophin-1 (*hBest-1*) im heterologen Expressionssystem (in CHO-K1-Zellen) und bei endogener Expression (in RPE-Zellen) (**unten**). Die Pfeile weisen auf die Regulation der jeweiligen Parameter hin (\uparrow , \downarrow); *p*-Werte: **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

Modified Ca^{2+} -currents	Current density	$V_{0.5}$	k_{act}
R218C	n.s.	n.s.	n.s.
T6P	n.s.	n.s.	n.s.
F80L	\downarrow ***	\uparrow ***	\downarrow ***
F305S	\downarrow **	\uparrow ***	\downarrow ***

Surface expression	$\text{Ca}_v1.3$		Mutant Best-1		Apical/basolateral
	CHO	RPE	CHO	RPE	
R218C	n.s.	\downarrow *	n.s.	n.s.	basolateral
T6P	\downarrow ***	\downarrow ***	\downarrow **	\downarrow ***	apical
F80L	\downarrow ***	\downarrow ***	\downarrow ***	\downarrow ***	basolateral
F305S	\downarrow ***	\downarrow ***	\downarrow ***	\downarrow ***	apical

3.2.8. Delokalisation von $\text{Ca}_v1.3$ und T6P in humanen RPE-Zellen

Mit dem Ziel, die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die physiologische Situation im RPE zu verbessern, wurden die experimentellen Daten aus polarisierten ssRPE-Zellen nun in *hRPE* Zellen validiert, die aus iPSCs differenziert wurden.

Da die Mutanten R218C und T6P in primären ssRPE-Zellen unterschiedliche Effekte auf die subzelluläre Lokalisation von $\text{Ca}_v1.3$ hatten, wurden nur diese beiden für die Validierung in *hRPE*-Zellen ausgewählt. Aufgrund der endogenen Expression von *hBest-1* und $\text{Ca}_v1.3$ (Abbildung 28), wurden *hRPE*-Zellen mit GFP-markierten WT- respektive mutantem *hBest-1* transfiziert (Abbildung 29).

Die konfokalen Aufnahmen in Abbildung 29 zeigten im Vergleich zu ssRPE-Zellen deutlich kleinere Zellen, die jedoch in der Morphologie vergleichbar waren. Während die Mutation R218C eine membranständige Lokalisation, vergleichbar mit WT *hBest-1*, zeigte, bewirkte die Mutante T6P auch in *hRPE*-Zellen einen gestörten zellulären Transport, erkennbar an einer unregelmäßigen Proteinlokalisierung im Bereich des Zytoplasmas. Es war keine Kolo-kalisation bei Überlagerung vom grünen (T6P-GFP) und blauen (β -Catenin) detektierbar (*merge*, Abbildung 29).

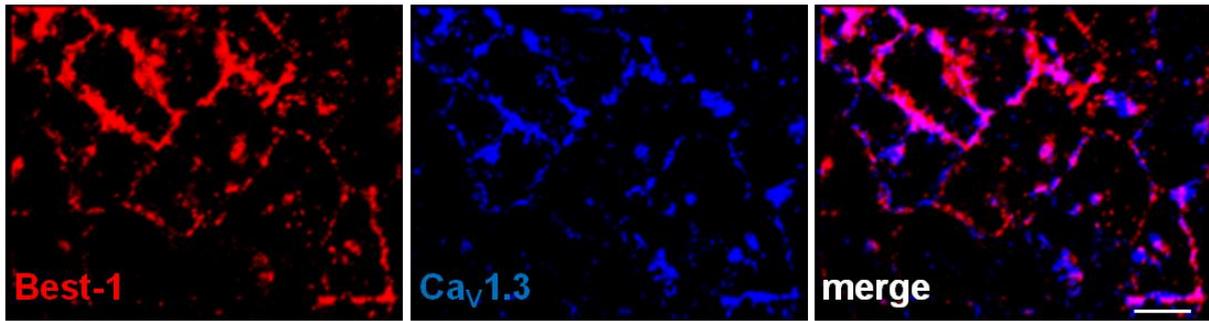


Abbildung 28: Endogene Expression von *humanem* Bestophin-1 (*hBest-1*) und *Ca_v1.3* in untransfizierten *hRPE*-Zellen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen die Überlagerung (*merge*) von endogen exprimiertem *hBest-1* (roter Kanal) und *Ca_v1.3* (blauer Kanal) in der Plasmamembran von polarisierten *hRPE*-Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 5 μm .

Auch die Proteinaggregation der Ca^{2+} -Kanalpore war in Anwesenheit der Mutante T6P unregelmäßig und clusterförmig in der Nähe des Zellkerns (roter Kanal) assoziiert. Im vertikalen optischen Schnitt (XZ-Ebenen, Abbildung 29) zeigte sich deutlich, dass T6P - im Vergleich zur basolateralen Proteinlokalisierung von WT *hBest-1* und R218C - apikal assoziiert war. Zusätzlich wurde apikal eine Kolo-kalisation vom Signal im roten Kanal (delokalisierte *Ca_v1.3*-Untereinheit) und grünem Kanal (T6P-GFP) detektiert (Ebene XZ, *merge*, Abbildung 29). Es zeigte sich keine Kolo-kalisation bei Überlagerung vom blauen (β -Catenin) und roten Kanal (*Ca_v1.3*) (Ebene XY, XZ und *merge*, Abbildung 29).

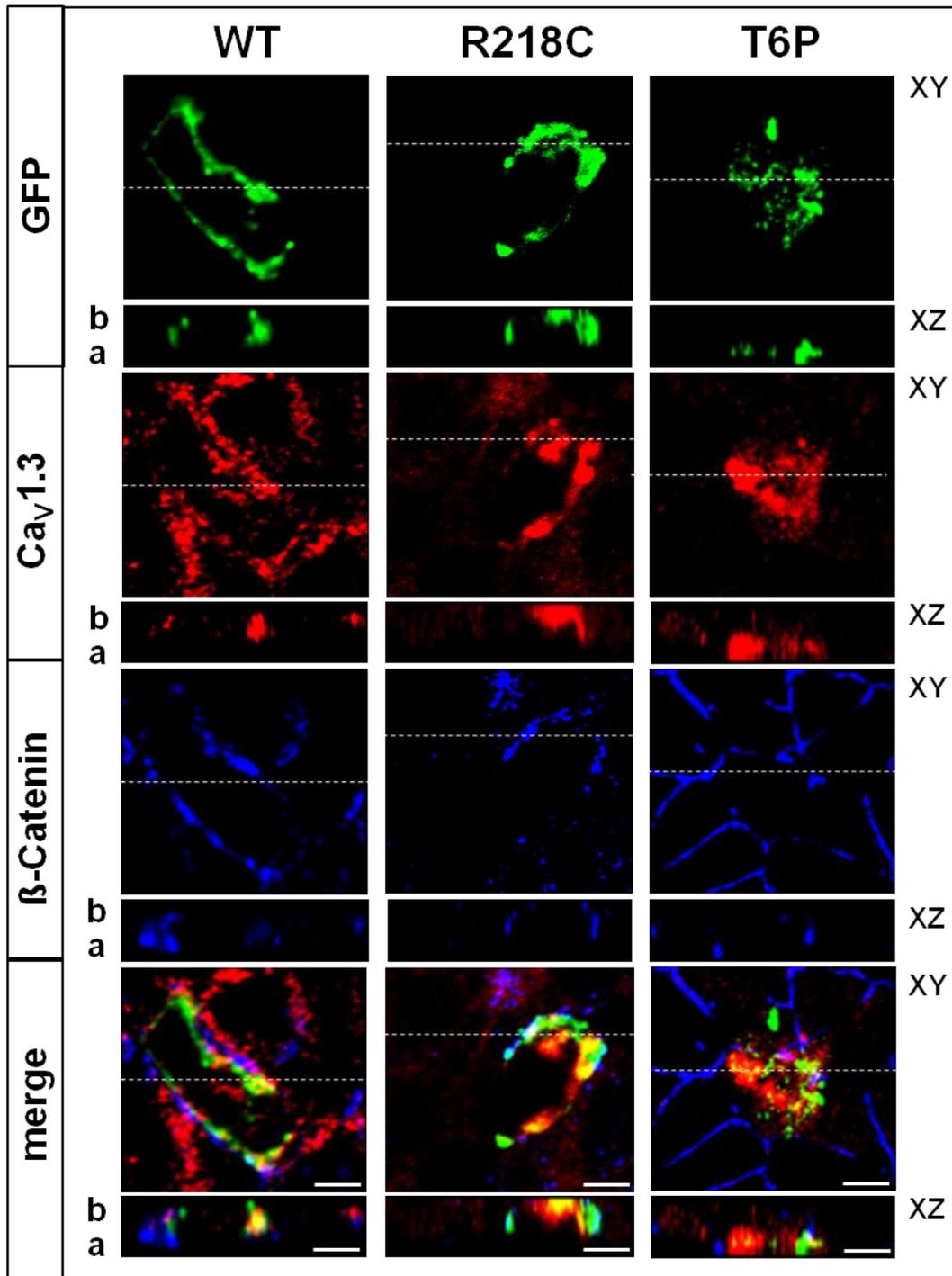


Abbildung 29: Subzelluläre Lokalisation von endogenem Cav1.3 in Anwesenheit von wildtypischem (WT) oder mutantern *humanen Bestrophin-1 (hBest-1)* in *hRPE*-Zellen. Dargestellt sind exemplarische konfokalmikroskopische Aufnahmen von *hRPE*-Zellen, die nach Transfektion mit WT oder mutantern GFP- (grün fluoreszierendes Protein) markierten *hBest-1*, immunzytochemisch gegen transfiziertes *hBest-1* (grüner Kanal), endogenes *hBest-1* (roter Kanal) und den Plasmamembran-Marker, β-Catenin, (blauer Kanal) gefärbt wurden. Die Überlagerung der drei Kanäle ist im letzten Kanal (*merge*) gezeigt. Gezeigt sind XY- und XZ- Ebenen aus Z-Stacks (jeweils 8 optische Schnitte mit einer Dicke von 0,73 μm). Die gestrichelte Linie in den XZ-Ansichten gibt jeweils die Ebene an, aus der die optischen vertikalen Schnitte (XZ) ermittelt wurden. Bei der XZ-Ansicht ist zusätzlich jeweils die apikale (a) und basolaterale (b) Orientierung der polarisierten RPE-Zellen dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 5 μm.

Die Quantifizierung der Korrelation von GFP-markiertem *hBest-1* (WT-GFP, R218C-GFP und T6P-GFP) und β -Catenin in *hRPE*-Zellen ist in Abbildung 30 (weiße Balken) dargestellt. Während R218C keinen signifikanten Unterschied zur Lokalisation von WT *hBest-1* in der Zellmembran (R218C-GFP: $0,34 \pm 0,06$, $n = 4$, $p = 0,410$ vs. WT-GFP: $0,42 \pm 0,07$, $n = 5$, Abbildung 30) zeigte, war die Lokalisation von T6P in der Plasmamembran signifikant reduziert (T6P-GFP: $0,20 \pm 0,05$, $n = 4$, $*p = 0,0368$, Abbildung 30).

Analog dazu war die Lokalisation von $Ca_v1.3$ (Abbildung 30, schwarze Balken) in Anwesenheit von T6P in der Plasmamembran signifikant reduziert im Vergleich zur Lokalisation von $Ca_v1.3$ in Anwesenheit von WT *hBest-1* ($Ca_v1.3$: $0,27 \pm 0,05$, $n = 4$, $**p = 0,0045$ vs. $0,49 \pm 0,03$, $n = 5$, Abbildung 30). Nach Transfektion der Mutante R218C zeigten sich auch in *hRPE*-Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Lokalisation der Ca^{2+} -Kanalphore ($Ca_v1.3$: $0,43 \pm 0,05$, $n = 4$, $p = 0,3466$, Abbildung 30).

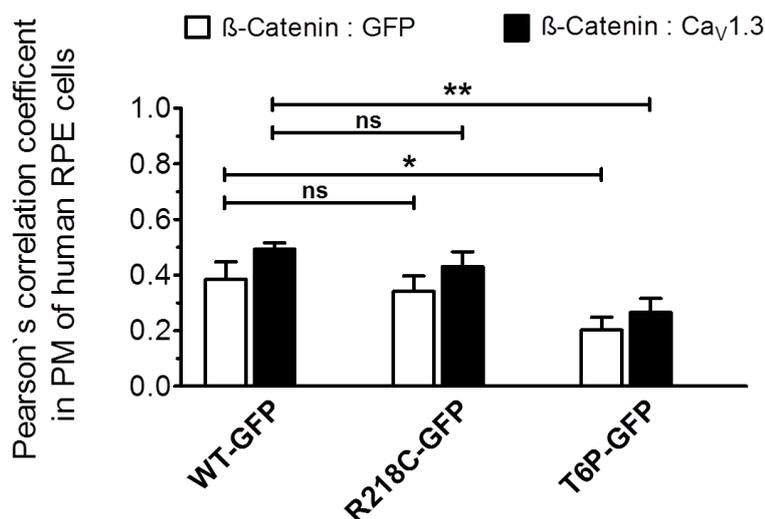


Abbildung 30: Quantifizierung der Korrelation von transfiziertem humanen Bestrophin-1 (*hBest-1*) und der $Ca_v1.3$ -Untereinheit mit der Plasmamembran in *hRPE*-Zellen.

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten aus der Analyse von Einzelzellen nach Pearson (PCC). Angegeben ist jeweils die Korrelation von GFP- (grün fluoreszierendes Protein) markiertem *hBest-1* (weiße Balken, $n = 4-6$ Zellen) und $Ca_v1.3$ (schwarze Balken, $n = 4-6$ Zellen) mit dem Plasmamembran-Marker, β -Catenin. Der PCC wurde im

Bereich von 0 bis 1 angeben, wobei 0 keine und 1 eine vollständige Korrelation in der Plasmamembran angibt. Die Analyse umfasst die Ergebnisse aus $n = 3$ Transfektionen pro Wildtyp (WT) und Mutante. (Alle Daten sind als MW \pm SEM angegeben; n gibt die Anzahl der Zellen an; p -Werte: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$)

Zusammenfassend konnten die Daten aus *hRPE*-Zellen für die Mutanten T6P und R218C die Ergebnisse aus heterologer Expression in CHO-K1-Zellen bestätigen. Die Mutante T6P zeigte einen signifikant negativen Effekt auf die Lokalisation der $Ca_v1.3$ -Kanalphore in der Plasmamembran, während R218C überwiegend membranständig lokalisiert war ohne die Lokalisation von $Ca_v1.3$ signifikant zu verändern.

4. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit steht die Regulation der Oberflächenexpression von L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen im RPE. Dazu wurde zum einen der Einfluss des Ca^{2+} -abhängigen Cl-Kanal, Best-1, untersucht. Der Mechanismus, durch welchen mutantes Best-1 den transmembranalen Ca^{2+} -Flux durch Ca^{2+} -Kanäle stört und somit die phagozytotische und sekretorische Funktion im RPE beeinträchtigt, ist bisher unklar. Es besteht die Hypothese, dass mutantes Best-1 die Oberflächenexpression von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen inhibiert. In heterologem Expressionssystem sowie in primären RPE-Zellen wurde gezeigt, dass sowohl die Aktivität als auch die Lokalisation von L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen in der Plasmamembran durch mutantes Best-1 inhibiert wird.

Zum anderen haben die Daten dieser Arbeit gezeigt, dass Rab27a einen direkten Einfluss auf biophysikalische sowie sekretorische Eigenschaften von L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen hat. Zunächst sollen die Ergebnisse aus der Analyse der Regulation von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen über Rab27a diskutiert werden.

4.1 Regulation von L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen über Rab27a

Die Ergebnisse aus dem heterologen Expressionssystem wurden bei Überexpression von Rab27a in ARPE-19 Zellen validiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Rab27a die biophysikalischen Eigenschaften von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen im RPE moduliert.

4.1.1. Heterologes Expressionssystem versus endogener Expression von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen

Im heterologen Expressionssystem waren I_{Ba} durch $\text{Ca}_v1.3/\beta_3$ -Kanäle in Anwesenheit von Rab27a signifikant unterschiedlich in der Stromdichte sowie Spannungsabhängigkeit von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen im Vergleich zu $\text{Ca}_v1.3$ -Ströme ohne Rab27a: Rab27a bewirkte eine signifikante Reduktion der Stromdichte heterolog exprimierter $\text{Ca}_v1.3$ -Kanalströme sowie eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu negativen Membranpotentialen. Die gemessenen I_{Ba} durch $\text{Ca}_v1.3/\beta_3$ -Kanäle zeigten vergleichbare Eigenschaften zu denjenigen in vorherigen Studien [54, 62, 90]. Bei endogener Expression von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen und Rab27a-Überexpression in ARPE-19 Zellen hat Rab27a die biophysikalischen Eigenschaften endogener $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle unterschiedlich moduliert. Wie in heterologer Expression beobachtet, führte die Anwesenheit von Rab27a auch bei endogener Expression von Rab27a und $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen zu einer signifikant reduzierten Stromdichte. Die Änderungen in der Spannungsabhängigkeit von endogen und heterolog exprimierten $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen waren jedoch unterschiedlich. Die Überexpression von Rab27a in ARPE-19 Zellen resultierte in einer Verschiebung zu positiven Membranpotentialen.

Die Unterschiede zwischen heterologer und endogener Expression können verschiedene Ursachen haben. Zum einen wird für die heterologe Expression $Ca_v1.3$ in der vollständigen Länge verwendet, während es sich bei endogen exprimiertem $Ca_v1.3$ um eine kürzere, gewebespezifische *Splice*-Variante handelt. Alternatives *Splicing* von $Ca_v1.3$ in Neuronen des Gehirns führt zu einer Aktivierung bei negativerem Potential, wobei die veränderte Inaktivierung abhängig von der jeweiligen *Splice*-Variante ist [91, 92]. Ähnliche Änderungen wurden im Sinusknoten des Herzens [93] und in inneren Haarzellen [94] beobachtet. Sogar die Sensitivität für den L-Typ-Kanalblocker, Dihydropyridin, war bei *Splice*-Varianten verändert [95]. Zum anderen ist bekannt, dass die Überexpression von Proteinen den zellulären Proteintransport beeinflusst. Es ist beschrieben, dass ein Cl^- -Kanal in der Zellmembran von Nierentubuluszellen der Ratte und im menschlichen Gewebe [96-98], bei heterologer Expression in Oozyten intrazellulär lokalisiert ist [99]. Ein weiterer Faktor, der die Unterschiede zwischen heterologer und endogener Expression erklären kann, ist die Abhängigkeit des Aktivierungsstatus von der Phosphorylierung. In HEK293-Zellen wurden heterolog exprimierte humane spannungsabhängige K^+ -Kanäle untersucht, die das Ca^{2+} -*Signalling* in humanen T-Lymphozyten regulieren. Diese zeigten in phosphorylierter Form eine reduzierte Aktivität [100], wohingegen die Phosphorylierung von endogen exprimiertem $K_v1.3$ eine Aktivierung des K^+ -Kanals bewirkt [101, 102]. Die Daten aus heterologer Expression belegen die Modulation des $Ca_v1.3$ -Kanals. Jedoch lässt deren Qualität sich nur im Kontext der Ergebnisse aus endogener Expression bewerten. Die Tatsache, dass ARPE-19 Zellen endogenes Rab27a und $Ca_v1.3$ exprimieren, deutet eine Interaktion beider Proteine unter physiologischen Bedingungen an. Dementsprechend könnte das zusätzlich exprimierte Rab27a die Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit heterologer und endogener Expression von $Ca_v1.3$ erklären.

4.1.2. Oberflächenexpression von $Ca_v1.3$ in Anwesenheit von Rab27a

In CHO-K1-Zellen zeigte die Analyse der Oberflächenexpression von Rab27a und $Ca_v1.3$ eine Kolokalisation von 96 %, was eine direkte Interaktion zwischen $Ca_v1.3$ -Kanal und Rab27a-Proteinen vermuten lässt. Die Analyse der Korrelation von $Ca_v1.3$ und dem Plasmamembran-Marker, $\alpha_5\beta_1$ Integrin, ergab bei Koexpression von $Ca_v1.3$ und Rab27a eine reduzierte Oberflächenexpression von der porenformenden Untereinheit um 10 %. Der Einfluss der kleinen GTPase auf die Oberflächenexpression von $Ca_v1.3$ -Kanälen ist demnach marginal. Einen größeren Effekt zeigte Rab27a auf die biophysikalischen Eigenschaften von L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanälen. In Anwesenheit von Rab27a war die Stromdichte spannungsabhängiger L-Typ- $Ca_v1.3$ -Kanäle um 70 % reduziert. Das bedeutet, dass Rab27a zelluläre Ca^{2+} -Signalkaskaden reguliert, indem es zum einen die Verfügbarkeit von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran beeinflusst und zum anderen die Ca^{2+} -Kanalporenaktivität

moduliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von Rab27a grundlegend für die Regulation der L-Typ-Ca²⁺-Kanalfunktion ist.

Bisher wurde die Modulation der Ionenkanalaktivität durch Rab-Proteine anhand von zwei Mechanismen beschrieben: Regulation der Oberflächenexpression der porenformenden Untereinheit oder direkte Modulation der Porenaktivität, wobei die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals auf die Modulation von Ca_v1.3-Kanälen durch Rab27a hinweisen. Der Transport von Ionenkanälen zur Plasmamembran – wie für epitheliale Natrium-(Na⁺-) Kanäle und für den *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) beschrieben – wird über Rab-Proteine kontrolliert [103]. Rab3, Rab27a und Rab4 reduzieren die Aktivität von epithelialen Na⁺-Kanälen in Abhängigkeit von ihrem GDP/GTP-Status bei Interaktion mit den Kanalproteinen und können so den zellulären Transport der Kanalproteine zur Plasmamembran beeinflussen [86, 103]. Im Fall von CFTR wurde der Einfluss von verschiedenen Rab-Proteinen auf die Ionenkanalaktivität sowie beschleunigte Recyclingprozesse von Kanalproteinen nachgewiesen [104-107]. Anhand der kleinen GTPase, Rab11b, einem bekannten Regulator des endosomalen Recyclings, wurde der Einfluss auf die Expression von spannungsabhängigen L-Typ-Ca_v1.2-Kanälen in der Plasmamembran untersucht [108]. Der Einsatz von kleinen eingreifenden (engl.: *small interfering*) RNAs oder dominant-negativen Mutanten in HEK293-Zellen resultierte dabei in größeren I_{Ba} und in einer höheren Ca_v1.2-Kanaldichte in der Plasmamembran. Rab11b limitiert demnach die Anzahl von Ca_v1.2-Kanälen in der Zelloberfläche [108]. Mehrere Studien haben die Modulation der Ca²⁺-Kanalaktivität durch Rab3-interagierende Moleküle beschrieben. Dieser Effekt basiert auf der direkten Interaktion von RIM1/2 mit VDCC-Proteinen [76, 77, 109]. Die verzögerte Inaktivierung von Ca_v1.3 durch die direkte Interaktion der β-Untereinheit mit RIM1/2, sowohl im heterologen Expressionssystem als auch bei endogener Expression, wurde bereits nachgewiesen [77, 109]. Die physikalische Interaktion von Rab27a mit Ca_v1.3-Kanälen konnte von Reichhart *et al.* über die Bindung an ein die porenformende Untereinheit von L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen anhand einer Deletionsmutante von Ca_v1.3 belegt werden [73]. Die Ergebnisse dieser Arbeit aus der Kollokalisierung von Ca_v1.3 mit Rab27a in CHO-K1-Zellen sind vergleichbar mit den Ergebnissen bei Überexpression beider Proteine in HEK293-Zellen sowie *in situ* in sagittalen Schnitten der Mausretina [73]. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine funktionelle Interaktion von Rab27a und Ca_v1.3-Kanälen *in vivo* an.

4.1.3. Modulation der Ca_v1.3-Kanalfunktion und VEGF-Sekretion durch Rab27a

Die Prenylierung von Rab27a wird über REP-1 reguliert [110]. In *in vivo*-Studien im murinen Modell mit einem konditionellem REP-1-*Knockout* wurde ein reduzierter LP im ERG beschrieben, der mit pathologischen Veränderungen der Chorioideremie korrelierte [111].

Zudem wurde in diesem Modell eine heterologe Verteilung von Melanosomen im RPE beobachtet, was ein charakteristisches Zeichen für die Dysfunktion von Rab27a ist [112]. Dies konnte auch in anderen *in vivo*-Studien im murinen Modell mit mutantern Rab27a nachgewiesen werden [111, 113]. Durch die fehlende Prenylierung von Rab-GTPasen kommt es zu morphologischen Veränderungen vom RPE und der Retina [67]. Rab27a ist auch in pankreatischen β -Zellen an der Prä-Exozytose als auch an der Endozytose sekretorischer Vesikel - abhängig vom Hydrolysezustand- beteiligt [114-116]. Rab27a gilt in phagozytotischen Prozessen als ein entscheidender Faktor, wie beispielsweise in Organellen lysosomalen Ursprungs von zytotoxischen T-Lymphozyten und Thrombozyten [72, 117]. Das RPE sezerniert unter anderem Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und VEGF in gesunden und unter pathologischen Bedingungen. VEGF wird konstant auf die basolaterale Seite vom RPE freigesetzt, um die Fenestrierung des chorioidalen Endotheliums zu gewährleisten. Die VEGF-Sekretion durch das RPE wird durch einen Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} ausgelöst, der entweder über die Aktivierung von Untergruppen L-Typ-Kanäle oder der *transient receptor potential vanilloid*- (TRPV2-) Kanäle [5, 118-121] vermittelt wird. L-Typ-Kanäle lösen die Freisetzung von VEGF über deren Aktivierung durch den bFGF-Rezeptor, FGFR-2, oder andere Tyrosinkinase [121]. Die Daten dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Überexpression von Rab27a in ARPE-19 Zellen in einer verminderten Sekretion von VEGF durch das RPE resultiert. Dazu passen die Ergebnisse aus den Analysen der $\text{Ca}_v1.3$ -Kanalaktivität in Abhängigkeit von Rab27a in heterologer Expression. Diese belegen, dass Rab27a den I_{Ba} durch die $\text{Ca}_v1.3$ -Kanalpore vermindert. Der inhibitorische Effekt von Rab27a auf die Zellfunktion im Allgemeinen wurde in mehreren Studien untersucht [122]. Es wurde beschrieben, dass Rab27a die Phagozytoseaktivität negativ beeinflusst [122]. Es ist außerdem nachgewiesen, dass Rab27a die Komplementsystem-aktivierte Phagozytose in einer Makrophagen-Zelllinie negativ reguliert [116]. Die Überexpression von Rab27a in Epithelzellen des Kolons führt zu einer verringerten Aktivität von epithelialen Na^+ -Kanäle durch die Reduktion der Kanaloberflächenexpression. Jedoch wurde in diesen Studien der zugrundeliegende Mechanismus des reduzierten zellulären Transports zur Zellmembran nicht näher untersucht [86, 103, 105]. Ein ähnlicher inhibitorischer Effekt von Rab27a wurde für den Transport in die Plasmamembran und somit für die Kanalaktivität von CFTR gezeigt [104-107]. Rab27a-GDP, das mit anderen Proteinen sekretorischer Vesikel interagiert, hat eine Reduktion der Sekretion des Neuropeptids Y *in vitro* gezeigt [81, 123]. Die Interaktion von Rab27a und $\text{Ca}_v1.3$ könnte in einer reduzierten Beteiligung von L-Typ-Kanälen am Ca^{2+} -Signalling im RPE und somit an der verringerten Freisetzung von VEGF resultieren [70]. Dies stellt möglicherweise einen Ansatz für das Verständnis der Pathomechanismen der Chorioideremie dar. Die mutationsabhängige Reduktion von Rab27a in Endosomen und Melanosomen, könnte durch den Verlust der

Rab27a/Ca_v1.3-Kanal-Interaktion und somit eine verringerte Effizienz zur Inhibierung von Ca_v1.3-vermittelter VEGF-Sekretion erklärt werden. In Konsequenz würde das zu exzessiv hohen VEGF-Werten der Chorioidea und in angrenzenden Geweben, wie dem RPE, führen. Eine gestörte Funktion von REP-1 führt bereits während der Embryonalentwicklung zu pathologischen Veränderungen der Chorioidea [110, 124-127]. Obgleich moderate Level von VEGF für die Erhaltung der Fenestrierung von chorioidalem Endothelium notwendig sind, um die Apoptose von Endothelzellen zu verhindern [5, 16, 128], können im adulten Auge hohe VEGF Level schädigende Auswirkungen haben [5]. Dabei kann es zum Einwachsen von Blutgefäßen der Chorioidea durch die Bruch'sche Membran in den subzellulären Raum kommen, was als klassische chorioidale Neovaskularisation bezeichnet wird [5]. Ein vergleichbarer Prozess konnte in RPE-Zellen aus chorioidalen neovaskulären Membranen beschrieben werden, die von Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration stammen [120]. In diesem Zusammenhang zeigten die RPE-Zellen eine gesteigerte VEGF-Sekretionsrate in Verbindung mit einer höheren Aktivität von Ca²⁺-Kanälen [120]. Das passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit, dass die Interaktion von Ca_v1.3 und Rab27a zu einer gestörten L-Typ-Ca²⁺-Kanalfunktion und somit zu einer verminderten VEGF-Sekretion im RPE führt. Dies würde die Hypothese bestätigen, dass Rab27a die L-Typ-Ca²⁺-Kanalfunktion negativ beeinflusst. Folglich würde der reduzierte inhibitorische Effekt von Rab27a auf L-Typ-Ca²⁺-Kanäle im RPE zu einer Dysregulation der physiologischen Struktur der Chorioidea führen.

4.2. Der Einfluss von mutantem hBest-1 auf L-Typ-Ca_v1.3-Kanäle

Funktionen vom RPE sind abhängig von Veränderungen der Ionenkanalaktivität im RPE. Das heißt, dass die Aufrechterhaltung der physiologischen Ionenkanalfunktion im RPE für den Prozess des Sehens essenziell ist. Der Ausfall von nur einer Funktion kann zur retinalen Degeneration und zum vollständigen Sehverlust führen. Ein Ziel derzeitiger Forschung ist es, die zellulären Mechanismen im RPE zu verstehen, die degenerativen Erkrankungen des Auges zugrunde liegen. Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, die die Bedeutung von Ca²⁺-Kanälen für die Erhaltung der visuellen Funktion untermauern, haben gezeigt, dass die circadiane Phagozytose von POS durch retinale Pigmentepithelzellen unter anderem über L-Typ-Ca_v1.3-Kanäle und hBest-1, reguliert wird [87]. Das Herunterregulieren (*Knockdown*) von Best-1 führte zu einer Beeinträchtigung der Phagozytose in ssRPE-Zellen [87]. Außerdem resultierte die Inhibierung spannungsabhängiger L-Typ-Ca²⁺-Kanäle durch (+)BayK8644, einem Ca²⁺-Kanalantagonisten, in einer Reduktion der Phagozytose *in vitro* [87]. Best-1 moduliert den intrazellulären Transport von Ca²⁺ über die direkte Interaktion mit der β-Untereinheit spannungsabhängiger L-Typ-Ca²⁺-Kanäle an der basolateralen Membran im RPE [90].

Wie bereits beschrieben verursachen Mutationen im *BEST1* unter anderem die BVMD, dessen diagnostisches Merkmal ein verminderter LP im EOG der betroffenen Patienten ist [29, 30, 129, 130]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Lokalisation von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran von RPE-Zellen durch die Anwesenheit von mutantern *hBest-1* inhibiert wird. Das bestätigt die Hypothese, dass die Ca²⁺-Kanalaktivität im RPE durch den Einfluss von Best-1 reguliert wird und deutet einen funktionellen Zusammenhang zwischen retinaler Degeneration und einer Fehlfunktion vom RPE hin. Im murinen Ca_v1.3-defizienten Modell wurde ein reduzierter LP gemessen [57], der auch in humanen Studien bei Inhibierung von L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen durch Dihydropyridin [131] beobachtet wurde. Über sarko- und endoplasmatische Ca²⁺-Kanäle (SERCA) werden Ca²⁺-Ionen unter Verbrauch von ATP aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum befördert. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Menge an Ca²⁺, die durch die Inhibierung der SERCA freigesetzt wird, nach dem *Knockdown* von *BEST1* über *small interfering RNA* reduziert war [14]. Um zu untersuchen, welche *Missense*-Mutanten von Best-1 die Oberflächenexpression des Ca²⁺-Kanals verändern, wurden vier der krankheitsassoziierten Mutanten (R218C, T6P, F80L und F305S) verwendet [17]. Da die Mutante F305S besonders starke Unterschiede in der subzellulären Proteinverteilung aufwies, ist davon auszugehen, dass der Bereich am C-Terminus besonders wichtig bei der posttranskriptionellen Modifikation von Proteinen ist. Ähnlich verhält es sich am N-Terminus bei der Mutante T6P, welche ebenso einen gestörten zellulären Transport von *hBest-1* bewirkt. Unabhängige Studien haben die Fehllokalisierung von Mutationen, die mit BVMD assoziiert werden, beschrieben.[30, 130]. Dies wurde auch im polarisierten Epithel (in diesem Fall in Nierenzellen aus dem Hund (engl.: *madin-darby canine kidney cells*, MDCK II)) gezeigt [130, 132]. In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass die Best-1-Mutationen, W93C und R218C, auf die Kinetik der Ca²⁺-Kanalaktivierung und Inaktivierung beeinflussen, obgleich mit unterschiedlicher Wirkung [34]. *In vivo* wurde in der Retina eines Patienten mit der Mutation W93C eine erhöhte Ansammlung von Lipofuszin nachgewiesen [133]. Diese Mutationen wurden in früheren Arbeiten für Lokalisationsanalysen von mehreren Arbeitsgruppen untersucht [33, 34, 46, 130, 132]

4.2.1. Co-IP-Effizienz

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass *hBest-1* über die β_4 -Untereinheit an den L-Typ-Ca_v1.3-Kanal bindet [11]. Dies konnte durch die Co-IP-Analysen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Dass auch für alle vier untersuchten Mutationen von *hBest-1* eine physikalische Interaktion mit dem L-Typ-Ca²⁺-Kanalkomplex nachgewiesen werden konnte, war die Grundlage für alle weiteren Experimente mit diesen Mutanten. Obgleich die Mutationen eine unterschiedlich starke Effizienz in den Co-IPs aufwiesen, konnte ausgeschlossen werden, dass eine der Mutanten nicht an den L-Typ-Kanal bindet. Die Co-IP

gegen die Ca_v1.3-Untereinheit war im Gegensatz zur Co-IP gegen β₄ deutlich ineffizienter, was möglicherweise auf die Größe der Ca_v1.3-Untereinheit (250 kDa) zurückzuführen ist. Das erklärt, warum, die IP- und L-Banden in den WBs nach Co-IP gegen Ca_v1.3 ein deutlich schwächeres Signal zeigten. Dass einige der untersuchten Mutanten eine reduzierte Effizienz der Co-IP zeigten, könnte damit erklärt werden, dass die vorherige Lyse der Zellen eine Änderung der Tertiärstruktur von Best-1 bewirkt hat und so Bindestellen für Ca²⁺ verdeckt wurden.

4.2.2. Korrelation von reduzierter Stromdichte und Oberflächenexpression

Die Messung an L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen im heterologen Expressionssystem in CHO-K1-Zellen ergab eine reduzierte Stromdichte von Typ-Ca_v1.3-Kanalströmen in Anwesenheit von mutantern *hBest-1*. Die elektrophysiologischen Parameter von heterolog exprimierten Ca_v1.3-Kanälen bei Koexpression mit T6P waren im Vergleich zu I_{Ba} in Anwesenheit von WT *hBest-1* verändert, wenn auch nicht signifikant. Die Mutationen F80L und F305S bewirkten hingegen eine signifikante Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von Ca_v1.3-Kanälen in Richtung positiver Membranpotentiale. Das bedeutet, dass heterolog exprimierte Ca_v1.3-Kanäle bei Koexpression von F80L und F305S bei positiveren Membranpotentialen aktivierten und kleinere maximale Stromamplituden in Abhängigkeit von der Zellgröße erreichten. In Anwesenheit dieser beiden Mutanten ist daher auch die Steigung der Stromspannungskennlinien kleiner. Besonders auffällig ist hier die Korrelation der verminderten Stromdichten mit der verminderten Proteinlokalisierung sowohl von mutantern *hBest-1* als auch der porenformenden Ca_v1.3-Untereinheit in der Plasmamembran von CHO-K1-Zellen in Anwesenheit von F80L oder F305S. Bei der Analyse der Oberflächenexpression im heterologen Expressionssystem zeigte die Mutante F305S die größte Fehllokalisierung im Zytoplasma, im Vergleich zu den anderen untersuchten Mutanten. Den größten Einfluss auf die Lokalisation der Ca_v1.3-Untereinheit zeigte hierbei die Mutante T6P. Die starke intrazelluläre Aggregation von T6P und F305S weist auf die Bedeutung der Aminosäuresequenzen am C- sowie am N-Terminus für den zellulären Proteintransport hin. Laut des verwendeten Topologiemodells von Milenkovic *et al.* ist die Mutation F305S am C-Terminus lokalisiert, während T6P am N-terminalen Ende des Best-1-Moleküls vorzufinden ist. Auch dem aktuellen Topologiemodell von Hühner Best-1 zu Folge liegen die Bindestellen für Ca²⁺ in der Nähe des C- und N-Terminus. In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass Ca²⁺-Kanäle über die β-Untereinheit an prolinreiche Bereiche im C-Terminus des Best-1-Moleküls binden [129]. Dies könnte die reduzierte Oberflächenexpression der Ca²⁺-Kanalpore in Anwesenheit von delokalisiertem F305S erklären. Durch den Austausch einer Base, könnte der zelluläre Transport zur Zellmembran - vermittelt durch eine modifizierte Tertiärstruktur des Best-1-Moleküls - gestört sein. Ca²⁺ würde vermehrt an intrazelluläres Best-1 binden und könnte nicht zur Plasmamembran transportiert werden. Dagegen haben

die Mutante F80L und F305S - den Ergebnissen zu Folge - einen stärkeren Effekt auf die L-Typ-Ca²⁺-Kanalaktivität im heterologen Expressionssystem als T6P. Da jedoch T6P in polarisierten RPE-Zellen deutliche Effekte auf die zelluläre Lokalisation der Ca²⁺-Kanalpore hat, sind die Ergebnisse aus heterologem Expressionssystem nicht repräsentativ für die Übertragung auf die physiologische Situation im polarisierten RPE im Auge. Da WT Best-1 im gesunden Auge an der basolateralen Membran lokalisiert wird, deutet die Fehllokalisation von T6P an der apikalen Membran in primären RPE-Zellen auf einen gestörten zellulären Proteintransport hin. Dabei ist anzunehmen, dass delokalisiertes Best-1 auf dem Weg zur Zellmembran im ER oder Golgi-Apparat aggregiert. Die reduzierte Stromdichte von L-Typ-Ca_v1.3-Kanälen in heterologem Expressionssystem im Zusammenhang mit der reduzierten Oberflächenexpression der Ca²⁺-Kanalpore in polaren RPE-Zellen deuten darauf hin, dass die Ca²⁺-Kanalfunktion auch *in vivo* durch den intrazellulären Transport von Best-1 reguliert wird.

4.2.3. Regulation der Oberflächenexpression von Ca_v1.3-Kanälen

Die Daten über die physikalische Interaktion zwischen Ca²⁺-Kanalproteinen und Bestrophinen sowie deren Effekte auf die Ionenkanalaktivität wurden in unpolaren nicht epitheloiden Zellen als Expressionssystem erhoben. Im heterologen Expressionssystem korrelierte die Lokalisation von Ca_v1.3 mit der Lokalisation von *hBest-1*. Die Oberflächenexpression von heterolog exprimierten Ca_v1.3-Kanälen war in Anwesenheit der Mutanten T6P, F80L und F305S stark reduziert. Die Oberflächenexpression von Ca_v1.3 war in Anwesenheit von R218C nur minimal herabgesetzt. Die Delokalisation von heterolog exprimiertem *hBest-1* hatte eine verminderte Oberflächenexpression der Ca²⁺-Kanalpore zur Folge. Das bedeutet, dass *hBest-1* im heterologen Expressionssystem einen Einfluss auf den zellulären Transport von Ca²⁺-Kanälen hat. Die verminderte Oberflächenexpression von Ca_v1.3 konnte auch in konfluenten polarisierten RPE-Zellen nachgewiesen werden. In ssRPE-Zellen zeigte mutantes *hBest-1* eine deutliche Delokalisation der Ca²⁺-Kanalpore im Zytosol. Wie auch im heterologen Expressionssystem war die Lokalisation von Ca_v1.3 in der Plasmamembran in Anwesenheit von F80L im Vergleich zum WT *hBest-1* signifikant herabgesetzt. Die Mutanten T6P und F305S zeigten hierbei den stärksten negativen Effekt auf den zellulären Transport der Ca²⁺-Kanalpore zur Zellmembran. In Anwesenheit von R218C war die Oberflächenexpression von Ca_v1.3 - sowohl in ssRPE als auch in *hRPE*-Zellen - nicht signifikant verändert. Dies passt zu der Beobachtung, dass R218C - vergleichbar mit WT *hBest-1* - in polaren RPE-Zellen überwiegend membranständig lokalisiert war, während T6P, F80L und F305S überwiegend zytosolische Lokalisierung zeigten. Entsprechend der nicht veränderten elektrophysiologischen Parameter von L-Typ-Strömen in Anwesenheit von R218C, zeigte die Analyse der polaren Orientierung von mutantem *hBest-1* eine basolaterale Orientierung dieser Mutante. Die stärkste Delokalisation

von *hBest-1* in polarisierten RPE-Zellen zeigte T6P. Entsprechend ergab die Analyse der polaren Orientierung von mutantern GFP-gebundenen *hBest-1*, dass T6P - im Vergleich zu den anderen Mutanten - die stärkste Tendenz zur apikalen Lokalisation in der Plasmamembran von ssRPE-Zellen zeigt. Auch F305S zeigte auch eine Tendenz zur apikalen Orientierung, während F80L eher basolateral lokalisiert war. Dies kann die Erklärung dafür sein, dass F80L zwar in polarisierten RPE-Zellen signifikant delokalisiert war, jedoch im Vergleich zu T6P und F305S geringere Abweichungen zum WT zeigte. Die Beobachtungen für R218C und T6P konnten in *hRPE*-Zellen, die aus induziert-pluripotenten Stammzellen zu RPE-Zellen differenziert wurden, bestätigt werden. Hierbei zeigten WT *hBest-1* und R218C eine basolaterale Lokalisation und hatten negativen Einfluss auf die Lokalisation der Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran. Im Gegensatz dazu hatte die Anwesenheit von T6P in *hRPE*-Zellen eine signifikant reduzierte Lokalisation der $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit in der Plasmamembran zur Folge. T6P zeigte eine diffuse Proteinverteilung im Zytosol. Die Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen aus vorherigen Studien überein. In MDCKII- und in fetalen *hRPE*-Zellen wurde beschrieben, dass die korrekte Lokalisation von Best-1 in der Plasmamembran der Zellen von der jeweiligen *hBest-1*-Mutation abhängig ist [31]. Diese könnten eine Fehllokalisierung von endogenem WT Best-1 verursachen oder durch die Anwesenheit von endogenem WT Best-1 positiv beeinflusst werden. Letzterer Effekt wurde für die Best-1 Mutante, W93C, beschrieben [130]. Ersteres trifft auf die in dieser Arbeit untersuchten *hBest-1* Mutationen T6P, F80L und F305S zu. Diese Mutationen führen zu einer Delokalisierung von *hBest-1*-Kanälen und verhindern so die funktionelle Interaktion mit Ca^{2+} -Kanälen im RPE, was weitreichende Folgen für andere zelluläre Prozesse im Auge haben kann [90]. Dass R218C in der basolateralen Membran exprimiert wird, konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden: zum einen in stabil transfizierten MDCKII-Zellen und zum anderen im murinen Modell, bei dem die Mutation über einen viral-vermittelten Gentransfer exprimiert wurde [132]. In murinen *BEST1-Knockout*- und *Knockin*-Modellen, die die BVMD-assoziierte Mutation W93C trugen, wurde gezeigt, dass Best-1 einen Einfluss auf die Regulation von Ca^{2+} in RPE-Zellen hat [35, 39]. Die Daten zeigen, dass spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in physikalischer wie auch funktioneller Interaktion mit den vier untersuchten *Missense*-Mutanten von *hBest-1* stehen. Studien von Rosenthal [34] haben gezeigt, dass WT Best-1, das in RPE-Zellen transfiziert wurde, eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung sowie eine beschleunigte Aktivierungskinetik von I_{Ba} durch L-Typ-Kanäle zur Folge hatte. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Untergruppe von Best-1 im ER angrenzend an die basolaterale Plasmamembran vom RPE assoziiert ist [40, 41, 134]. Die Delokalisierung von Best-1 könnte möglicherweise die Interaktion mit STIM1 stören und die Freisetzung von Ca^{2+} aus SOCE verhindern. Dies lässt

eine entscheidende Funktion von Best-1 bei der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase im RPE vermuten.

4.2.4. Dominant negativer Effekt von mutantern *hBest-1*

BVMD wird autosomal-dominant vererbt, sodass für die Untersuchung der zellulären Pathologie der BVMD die Anwesenheit von sowohl mutantern als auch WT Best-1 von essenzieller Bedeutung ist. In MDCKII-Zellen wurde gezeigt, dass unter anderem die Mutationen R218C, T6P, F80L und F305S den intrazellulären Transport von Best-1 stören [132]. Da die Proteinlokalisierung in MDCKII- und in RPE-Zellen unterschiedlich ist und MDCKII-Zellen kein endogenes Best-1 exprimieren, stellen MDCKII-Zellen ein nur sehr eingeschränktes Modell für die Analyse der Proteinlokalisierung dar [135]. Die Ergebnisse dieser Arbeit aus polarisierten ssRPE- und *hRPE*-Zellen bringen daher zusätzliche Erkenntnisse, die auf die physiologischen Bedingungen im RPE des menschlichen Auges übertragen werden könnten: In polarisierten ssRPE-Zellen hatte die Koexpression von mutantern Best-1 die Delokalisierung von endogenem WT *hBest-1* zur Folge; auch in *hRPE*-Zellen hatte die Anwesenheit von mutantern *hBest-1* einen negativen Effekt auf den zellulären Transport von endogenem WT *hBest-1*. Vorherige Studien zur Analyse des autosomal-dominanten Effekts von mutantern *hBest-1* in polarisierten ssRPE-Zellen haben gezeigt, dass die endogene Expression von WT ssBest-1 durch den gestörten zellulären Transport von mutantern *hBest-1* zur Plasmamembran negativ beeinflusst wird [130]. Andere Studien aus *hRPE*-Zellen bestätigen, dass nur wenige der BVMD-assoziierten Mutationen einen positiven Einfluss auf endogen exprimiertes Best-1 haben [134]. Es wurde außerdem gezeigt, dass Cl^- -Ströme durch endogenes WT Best-1 in Anwesenheit von mutantern Best-1 inhibiert werden [136, 137].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Best-1 entscheidend an der Regulation von Ca^{2+} -Kanälen in der basolateralen Membran im RPE beteiligt ist. Die Delokalisierung von endogenem Best-1 führt zu einer Störung im Transport von $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen zur Plasmamembran. Mutantes Best-1 könnte möglicherweise innerhalb des rauhen ER aggregieren, wo die Boten-RNA des mutanten Best-1 nicht als Membranprotein translatiert wird. Es ist auch möglich, dass die Mutanten innerhalb des Golgi-Apparat aggregieren, da sie aufgrund des Basenaustausches eine veränderte Proteinmodifikation erfahren und nicht zur Zellmembran weitergeleitet werden. Der gestörte intrazelluläre Transport von Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanälen könnte das Ca^{2+} -Signalling der Zelle stören. Zudem könnte die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern gestört sein. Der Verlust der Ca^{2+} -Kanalaktivität durch fehlende Interaktion mit Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanälen würde die circadiane Regulation der Phagozytose im RPE beeinträchtigen. Dies hätte eine erhöhte Aggregation von Lipofuszin in der Makula als mögliche Konsequenz zur Folge und könnte

den reduzierten LP im EOG bei Patienten mit BVMD erklären. Ohne die Regulation der Aktivität von L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen über Best-1 an der basolateralen Membran von RPE-Zellen, würde das RPE in seinen Funktionen, die für das Aufrechterhalten der visuellen Funktion essenziell sind, beeinträchtigt sein.

4.3. Fazit und Ausblick

Der Funktionsverlust von Rab27a in der Retina resultiert in einem fortschreitenden Zerfall von Aderhaut, Retina und RPE und führt schließlich zur Erblindung [71]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen den inhibitorischen Effekt von Rab27a auf die L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivität, wobei Rab27a eine reduzierte Stromdichte und eine verminderte VEGF-Sekretion durch das RPE bewirkt. Der Einfluss von Rab27a auf die Oberflächenexpression von L-Typ-Kanälen ist hingegen nur marginal. Die Tatsache, dass die Sekretion von Wachstumsfaktoren über Rab27a moduliert wird, bestätigt die funktionelle Regulation von L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen über Rab27a. Ergänzend zu ihrer Bedeutung beim zellulären Vesikeltransport, eröffnen diese Ergebnisse einen neuen Einblick in die Funktion von Rab-Proteinen, L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zu regulieren. Es ist zu vermuten, dass die Interaktion von $\text{Ca}_v1.3$ und Rab27a entsprechend *in vivo* stattfindet. Der Einfluss von Rab27a auf Ca^{2+} -Kanäle könnte anhand von ERG-Messungen an Rab27a-defizienten Mäusen untersucht werden. Das Verständnis der Interaktion von Ca^{2+} -Kanälen mit Rab-GTPasen könnte dabei helfen, die Regulation der Sekretion im Allgemeinen und die Sekretion im RPE im Speziellen besser zu verstehen.

Zusätzlich wurde die funktionelle Regulation von L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen über Best-1 nachgewiesen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure bei der Translation von Best-1 unterschiedliche Auswirkungen auf die Lokalisation des Best-1-Proteins hat und zusätzlich den zellulären Transport der porenformenden $\text{Ca}_v1.3$ -Untereinheit zur Plasmamembran behindert. Dies bedeutet, dass die Aktivität des L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanals von der zellulären Best-1-Lokalisation abhängig ist. Der dominant-negative Effekt von mutantern Best-1 konnte in polarisierten ssRPE-Zellen nachgewiesen werden. Eine reduzierte Anzahl von Ca^{2+} -Kanälen in RPE-Zellen könnte die verminderte Stromdichte der L-Typ-Kanäle in Anwesenheit von mutantern *hBest-1* erklären. Allerdings kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Aktivität der Kanäle der Ca^{2+} -Kanäle durch mutantes Best-1 vermindert wird. Um dies zu überprüfen, sollten weitere elektrophysiologische Messungen der sogenannten *gating currents* an L-Typ- $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen in Anwesenheit von mutantern *hBest-1* folgen. Dabei könnte die Aktivität der Ca^{2+} -Kanalpore bei Inhibierung des I_{Ba} durch Cobalt gemessen werden. Zusätzlich könnte durch den Einsatz von spezifischen Markern für Matrixproteine im Golgi-Apparat oder in Lysosomen, wie dem *early endosome antigen 1*, Rab7 oder dem *lysosomal associated membrane protein* immunzytochemisch analysiert werden, wo mutantes Best-1 und/oder der

Ca²⁺-Kanal intrazellulär aggregieren. Die Daten zeigen, dass Best-1 als wichtiger Regulator von Ca_v1.3-Kanälen an der basolateralen Membran im RPE fungiert. Da das RPE in direkter Interaktion mit Photorezeptoren steht, kommt Best-1 eine essenzielle Bedeutung bei der visuellen Funktion zu. Der Zusammenhang von retinaler Degeneration und der Regulation der Oberflächenexpression und der Aktivität von Ca²⁺-Kanälen über Best-1 könnte die Möglichkeit für neue Therapieansätze bei BVMD-Patienten eröffnen. Zu verstehen, wie sich RPE-Zellen und Photorezeptoren gegenseitig beeinflussen, ist essenziell für die Entwicklung von Therapien bei degenerativen Erkrankungen im Auge. Die Forschung an molekularen Mechanismen zur Regulation von Ionenkanälen stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz dar, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen.

Literaturverzeichnis

- [1] K. Zhang, L. Zhang, R.N. Weinreb, Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma, *Nature reviews. Drug discovery*, 11 (2012) 541-559.
- [2] M.M. Nociari, S. Kiss, E. Rodriguez-Boulan, Lipofuscin Accumulation into and Clearance from Retinal Pigment Epithelium Lysosomes: Physiopathology and Emerging Therapeutics, (2017).
- [3] D. Bok, The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision, *Journal of cell science. Supplement*, 17 (1993) 189-195.
- [4] P.D. Kiser, M. Golczak, A. Maeda, K. Palczewski, Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina, *Biochimica et biophysica acta*, 1821 (2012) 137-151.
- [5] O. Strauss, The retinal pigment epithelium in visual function, *Physiol Rev*, 85 (2005) 845-881.
- [6] M. Boulton, N.M. McKechnie, J. Breda, M. Bayly, J. Marshall, The formation of autofluorescent granules in cultured human RPE, *Investigative ophthalmology & visual science*, 30 (1989) 82-89.
- [7] M. Boulton, P. Dayhaw-Barker, The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes, *Eye (London, England)*, 15 (2001) 384-389.
- [8] T.D. Lamb, S.P. Collin, E.N. Pugh, Jr., Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup, *Nature reviews. Neuroscience*, 8 (2007) 960-976.
- [9] J.C. Saari, Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture, *Investigative ophthalmology & visual science*, 41 (2000) 337-348.
- [10] F. Gonzalez-Fernandez, J.I. Healy, Early expression of the gene for interphotoreceptor retinol-binding protein during photoreceptor differentiation suggests a critical role for the interphotoreceptor matrix in retinal development, *The Journal of cell biology*, 111 (1990) 2775-2784.
- [11] M. Ishikawa, Y. Sawada, T. Yoshitomi, Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells, *Experimental eye research*, 133 (2015) 3-18.
- [12] C.D. Williams, L.J. Rizzolo, Remodeling of junctional complexes during the development of the outer blood-retinal barrier, *The Anatomical record*, 249 (1997) 380-388.
- [13] K. Sugawara, J. Deguchi, T. Okami, A. Yamamoto, K. Omori, M. Uyama, Y. Tashiro, Immunocytochemical analyses of distributions of Na, K-ATPase and GLUT1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells, *Cell structure and function*, 19 (1994) 21-28.
- [14] S. Hamann, Molecular mechanisms of water transport in the eye, *International review of cytology*, 215 (2002) 395-431.
- [15] S.S. Miller, R.H. Steinberg, Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium, *Experimental eye research*, 25 (1977) 235-248.
- [16] A.N. Witmer, G.F. Vrensen, C.J. Van Noorden, R.O. Schlingemann, Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease, *Progress in retinal and eye research*, 22 (2003) 1-29.
- [17] S.P. Becerra, R.N. Fariss, Y.Q. Wu, L.M. Montuenga, P. Wong, B.A. Pfeffer, Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution, *Experimental eye research*, 78 (2004) 223-234.
- [18] N. Ogata, L. Wang, N. Jo, J. Tombran-Tink, K. Takahashi, D. Mrazek, M. Matsumura, Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury, *Current eye research*, 22 (2001) 245-252.
- [19] M. Cayouette, S.B. Smith, S.P. Becerra, C. Gravel, Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations, *Neurobiology of disease*, 6 (1999) 523-532.
- [20] A.F. Wright, C.F. Chakarova, M.M. Abd El-Aziz, S.S. Bhattacharya, Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait, *Nature reviews. Genetics*, 11 (2010) 273-284.
- [21] M.M. Nociari, G.L. Lehmann, A.E. Perez Bay, R.A. Radu, Z. Jiang, S. Goicochea, R. Schreiner, J.D. Warren, J. Shan, S. Adam de Beaumais, M. Menand, M. Sollogoub, F.R. Maxfield, E. Rodriguez-Boulan, Beta cyclodextrins bind, stabilize, and remove lipofuscin bisretinoids from retinal pigment

- epithelium, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (2014) E1402-1408.
- [22] E. Buschini, A. Piras, R. Nuzzi, A. Vercelli, Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina, *Progress in neurobiology*, 95 (2011) 14-25.
- [23] A. Marquardt, H. Stohr, L.A. Passmore, F. Kramer, A. Rivera, B.H. Weber, Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease), *Hum Mol Genet*, 7 (1998) 1517-1525.
- [24] K. Petrukhin, M.J. Koisti, B. Bakall, W. Li, G. Xie, T. Marknell, O. Sandgren, K. Forsman, G. Holmgren, S. Andreasson, M. Vujic, A.A. Bergen, V. McGarty-Dugan, D. Figueroa, C.P. Austin, M.L. Metzker, C.T. Caskey, C. Wadelius, Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy, *Nature genetics*, 19 (1998) 241-247.
- [25] F. Kramer, K. White, D. Pauleikhoff, A. Gehrig, L. Passmore, A. Rivera, G. Rudolph, U. Kellner, M. Andrassi, B. Lorenz, K. Rohrschneider, A. Blankenagel, B. Jurklies, H. Schilling, F. Schutt, F.G. Holz, B.H. Weber, Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration, *European journal of human genetics : EJHG*, 8 (2000) 286-292.
- [26] K. White, A. Marquardt, B.H. Weber, VMD2 mutations in vitelliform macular dystrophy (Best disease) and other maculopathies, *Human mutation*, 15 (2000) 301-308.
- [27] A.D. Marmorstein, H.E. Cross, N.S. Peachey, Functional roles of bestrophins in ocular epithelia, *Progress in retinal and eye research*, 28 (2009) 206-226.
- [28] C.J. Boon, B.J. Klevering, B.P. Leroy, C.B. Hoyng, J.E. Keunen, A.I. den Hollander, The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene, *Progress in retinal and eye research*, 28 (2009) 187-205.
- [29] H.C. Hartzell, Z. Qu, K. Yu, Q. Xiao, L.T. Chien, Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies, *Physiol Rev*, 88 (2008) 639-672.
- [30] R.F. Mullins, M.H. Kuehn, E.A. Faidley, N.A. Syed, E.M. Stone, Differential macular and peripheral expression of bestrophin in human eyes and its implication for best disease, *Investigative ophthalmology & visual science*, 48 (2007) 3372-3380.
- [31] V.M. Milenkovic, A. Rivera, F. Horling, B.H. Weber, Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane, *J Biol Chem*, 282 (2007) 1313-1321.
- [32] A.D. Marmorstein, L.Y. Marmorstein, M. Rayborn, X. Wang, J.G. Hollyfield, K. Petrukhin, Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 12758-12763.
- [33] T. Tsunenari, J. Nathans, K.W. Yau, Ca²⁺-activated Cl⁻ current from human bestrophin-4 in excised membrane patches, *J Gen Physiol*, 127 (2006) 749-754.
- [34] R. Rosenthal, B. Bakall, T. Kinnick, N. Peachey, S. Wimmers, C. Wadelius, A. Marmorstein, O. Strauss, Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20 (2006) 178-180.
- [35] Y. Zhang, J.B. Stanton, J. Wu, K. Yu, H.C. Hartzell, N.S. Peachey, L.Y. Marmorstein, A.D. Marmorstein, Suppression of Ca²⁺ signaling in a mouse model of Best disease, *Hum Mol Genet*, 19 (2010) 1108-1118.
- [36] S.C. Stotz, D.E. Clapham, Anion-sensitive fluorophore identifies the *Drosophila* swell-activated chloride channel in a genome-wide RNA interference screen, *PloS one*, 7 (2012) e46865.
- [37] R. Fischmeister, H.C. Hartzell, Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels, *J Physiol*, 562 (2005) 477-491.
- [38] A.A. Johnson, Y.S. Lee, A.J. Chadburn, P. Tammaro, F.D. Manson, L.Y. Marmorstein, A.D. Marmorstein, Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1, *Experimental eye research*, 121 (2014) 74-85.

- [39] L.Y. Marmorstein, J. Wu, P. McLaughlin, J. Yocom, M.O. Karl, R. Neussert, S. Wimmers, J.B. Stanton, R.G. Gregg, O. Strauss, N.S. Peachey, A.D. Marmorstein, The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1), *J Gen Physiol*, 127 (2006) 577-589.
- [40] R. Neussert, C. Müller, V.M. Milenkovic, O. Strauss, The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 460 (2010) 163-175.
- [41] O. Strauss, C. Müller, N. Reichhart, E. Tamm, N. Mas Gomez, *The Role of Bestrophin-1 in Intracellular Ca²⁺ Signaling*, 2014.
- [42] H. Sun, T. Tsunenari, K.W. Yau, J. Nathans, The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002) 4008-4013.
- [43] V.M. Milenkovic, T. Langmann, R. Schreiber, K. Kunzelmann, B.H. Weber, Molecular evolution and functional divergence of the bestrophin protein family, *BMC evolutionary biology*, 8 (2008) 72.
- [44] H. Stohr, A. Marquardt, I. Nanda, M. Schmid, B.H. Weber, Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family, *European journal of human genetics : EJHG*, 10 (2002) 281-284.
- [45] B. Bakall, P. McLaughlin, J.B. Stanton, Y. Zhang, H.C. Hartzell, L.Y. Marmorstein, A.D. Marmorstein, Bestrophin-2 is involved in the generation of intraocular pressure, *Investigative ophthalmology & visual science*, 49 (2008) 1563-1570.
- [46] R. Barro-Soria, F. Aldehni, J. Almaca, R. Witzgall, R. Schreiber, K. Kunzelmann, ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 459 (2010) 485-497.
- [47] A.A. Johnson, K.E. Guziewicz, C.J. Lee, R.C. Kalathur, J.S. Pulido, L.Y. Marmorstein, A.D. Marmorstein, Bestrophin 1 and retinal disease, *Progress in retinal and eye research*, 58 (2017) 45-69.
- [48] S. Lee, B.E. Yoon, K. Berglund, S.J. Oh, H. Park, H.S. Shin, G.J. Augustine, C.J. Lee, Channel-mediated tonic GABA release from glia, *Science (New York, N.Y.)*, 330 (2010) 790-796.
- [49] M. Boudes, C. Sar, A. Menigoz, C. Hilaire, M.O. Pequignot, A. Kozlenkov, A. Marmorstein, P. Carroll, J. Valmier, F. Scamps, Best1 is a gene regulated by nerve injury and required for Ca²⁺-activated Cl⁻ current expression in axotomized sensory neurons, *J Neurosci*, 29 (2009) 10063-10071.
- [50] A. Milenkovic, C. Brandl, V.M. Milenkovic, T. Jendryke, L. Sirianant, P. Wanitchakool, S. Zimmermann, C.M. Reiff, F. Horling, H. Schrewe, R. Schreiber, K. Kunzelmann, C.H. Wetzel, B.H. Weber, Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (2015) E2630-2639.
- [51] V. Kane Dickson, L. Pedi, S.B. Long, Structure and insights into the function of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel, *Nature*, 516 (2014) 213-218.
- [52] T. Yang, Q. Liu, B. Kloss, R. Bruni, R.C. Kalathur, Y. Guo, E. Kloppmann, B. Rost, H.M. Colecraft, W.A. Hendrickson, Structure and selectivity in bestrophin ion channels, *Science (New York, N.Y.)*, 346 (2014) 355-359.
- [53] W.A. Catterall, Voltage-gated calcium channels, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3 (2011) a003947.
- [54] A. Koschak, D. Reimer, I. Huber, M. Grabner, H. Glossmann, J. Engel, J. Striessnig, alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages, *J Biol Chem*, 276 (2001) 22100-22106.
- [55] W.A. Catterall, Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Annual review of cell and developmental biology*, 16 (2000) 521-555.
- [56] J. Striessnig, A. Pinggera, G. Kaur, G. Bock, P. Tuluc, L-type Ca²⁺ channels in heart and brain, *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling*, 3 (2014) 15-38.
- [57] J. Wu, A.D. Marmorstein, J. Striessnig, N.S. Peachey, Voltage-dependent calcium channel CaV1.3 subunits regulate the light peak of the electroretinogram, *J Neurophysiol*, 97 (2007) 3731-3735.

- [58] Z. Buraei, J. Yang, The α_1 subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels, *Physiol Rev*, 90 (2010) 1461-1506.
- [59] R. Kollmar, L.G. Montgomery, J. Fak, L.J. Henry, A.J. Hudspeth, Predominance of the α_1D subunit in L-type voltage-gated Ca^{2+} channels of hair cells in the chicken's cochlea, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 14883-14888.
- [60] J. Platzer, J. Engel, A. Schrott-Fischer, K. Stephan, S. Bova, H. Chen, H. Zheng, J. Striessnig, Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels, *Cell*, 102 (2000) 89-97.
- [61] S. Barnes, M.E. Kelly, Calcium channels at the photoreceptor synapse, *Advances in experimental medicine and biology*, 514 (2002) 465-476.
- [62] V.M. Milenkovic, S. Krejcová, N. Reichhart, A. Wagner, O. Strauss, Interaction of bestrophin-1 and Ca^{2+} channel beta-subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus, *PloS one*, 6 (2011) e19364.
- [63] S.N. Yang, P.O. Berggren, The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology, *Endocrine reviews*, 27 (2006) 621-676.
- [64] A.P. Adamis, D.T. Shima, K.T. Yeo, T.K. Yeo, L.F. Brown, B. Berse, P.A. D'Amore, J. Folkman, Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 193 (1993) 631-638.
- [65] M. Kuroki, E.E. Voest, S. Amano, L.V. Beerepoot, S. Takashima, M. Tolentino, R.Y. Kim, R.M. Rohan, K.A. Colby, K.T. Yeo, A.P. Adamis, Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo, *The Journal of clinical investigation*, 98 (1996) 1667-1675.
- [66] P.F. Lopez, B.D. Sippy, H.M. Lambert, A.B. Thach, D.R. Hinton, Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes, *Investigative ophthalmology & visual science*, 37 (1996) 855-868.
- [67] T. Tolmachova, R. Anders, J. Stinchcombe, G. Bossi, G.M. Griffiths, C. Huxley, M.C. Seabra, A general role for Rab27a in secretory cells, *Molecular biology of the cell*, 15 (2004) 332-344.
- [68] M. Fukuda, Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65 (2008) 2801-2813.
- [69] B.R. Ali, M.C. Seabra, Targeting of Rab GTPases to cellular membranes, *Biochemical Society transactions*, 33 (2005) 652-656.
- [70] A.Q. Gomes, B.R. Ali, J.S. Ramalho, R.F. Godfrey, D.C. Barral, A.N. Hume, M.C. Seabra, Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif, *Molecular biology of the cell*, 14 (2003) 1882-1899.
- [71] A.N. Hume, L.M. Collinson, A. Rapak, A.Q. Gomes, C.R. Hopkins, M.C. Seabra, Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes, *The Journal of cell biology*, 152 (2001) 795-808.
- [72] M.C. Seabra, E.H. Mules, A.N. Hume, Rab GTPases, intracellular traffic and disease, *Trends in molecular medicine*, 8 (2002) 23-30.
- [73] N. Reichhart, M. Markowski, S. Ishiyama, A. Wagner, S. Crespo-Garcia, T. Schorb, J.S. Ramalho, V.M. Milenkovic, R. Fockler, M.C. Seabra, O. Strauss, Rab27a GTPase modulates L-type Ca^{2+} channel function via interaction with the II-III linker of $\text{Ca}_v1.3$ subunit, *Cell Signal*, 27 (2015) 2231-2240.
- [74] A. Assali, C. Le Magueresse, M. Bennis, X. Nicol, P. Gaspar, A. Rebsam, RIM1/2 in retinal ganglion cells are required for the refinement of ipsilateral axons and eye-specific segregation, *Sci Rep*, 7 (2017) 3236.
- [75] T. Coppola, S. Magnin-Luthi, V. Perret-Menoud, S. Gattesco, G. Schiavo, R. Regazzi, Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca^{2+} channels, SNAP-25, and synaptotagmin, *J Biol Chem*, 276 (2001) 32756-32762.

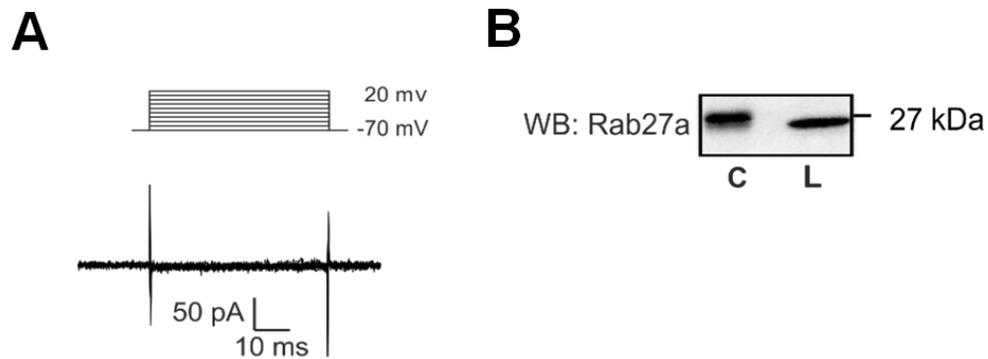
- [76] M.A. Gandini, A. Sandoval, R. Gonzalez-Ramirez, Y. Mori, M. de Waard, R. Felix, Functional coupling of Rab3-interacting molecule 1 (RIM1) and L-type Ca²⁺ channels in insulin release, *J Biol Chem*, 286 (2011) 15757-15765.
- [77] M. Gebhart, G. Juhasz-Vedres, A. Zuccotti, N. Brandt, J. Engel, A. Trockenbacher, G. Kaur, G.J. Obermair, M. Knipper, A. Koschak, J. Striessnig, Modulation of Cav1.3 Ca²⁺ channel gating by Rab3 interacting molecule, *Molecular and cellular neurosciences*, 44 (2010) 246-259.
- [78] M. Geppert, V.Y. Bolshakov, S.A. Siegelbaum, K. Takei, P. De Camilli, R.E. Hammer, T.C. Sudhof, The role of Rab3A in neurotransmitter release, *Nature*, 369 (1994) 493-497.
- [79] M. Geppert, Y. Goda, C.F. Stevens, T.C. Sudhof, The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion, *Nature*, 387 (1997) 810-814.
- [80] H. Gomi, K. Mori, S. Itohara, T. Izumi, Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane, *Molecular biology of the cell*, 18 (2007) 4377-4386.
- [81] M. Fukuda, E. Kanno, C. Saegusa, Y. Ogata, T.S. Kuroda, Slp4-a/granuphilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells, *J Biol Chem*, 277 (2002) 39673-39678.
- [82] T. Tsuboi, M. Fukuda, Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells, *Journal of cell science*, 119 (2006) 2196-2203.
- [83] Z. Yi, H. Yokota, S. Torii, T. Aoki, M. Hosaka, S. Zhao, K. Takata, T. Takeuchi, T. Izumi, The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules, *Molecular and cellular biology*, 22 (2002) 1858-1867.
- [84] K. Kasai, M. Ohara-Imaizumi, N. Takahashi, S. Mizutani, S. Zhao, T. Kikuta, H. Kasai, S. Nagamatsu, H. Gomi, T. Izumi, Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation, *The Journal of clinical investigation*, 115 (2005) 388-396.
- [85] T. Aizawa, M. Komatsu, Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling, *The Journal of clinical investigation*, 115 (2005) 227-230.
- [86] S.K. Saxena, H. Horiuchi, M. Fukuda, Rab27a regulates epithelial sodium channel (ENaC) activity through synaptotagmin-like protein (SLP-5) and Munc13-4 effector mechanism, *Biochemical and biophysical research communications*, 344 (2006) 651-657.
- [87] C. Muller, N. Mas Gomez, P. Ruth, O. Strauss, CaV1.3 L-type channels, maxiK Ca(2+)-dependent K(+) channels and bestrophin-1 regulate rhythmic photoreceptor outer segment phagocytosis by retinal pigment epithelial cells, *Cell Signal*, 26 (2014) 968-978.
- [88] K.C. Dunn, A.E. Aotaki-Keen, F.R. Putkey, L.M. Hjelmeland, ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties, *Experimental eye research*, 62 (1996) 155-169.
- [89] B. Sakmann, E. Neher, Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes, *Annual review of physiology*, 46 (1984) 455-472.
- [90] N. Reichhart, V.M. Milenkovic, C.A. Halsband, S. Cordeiro, O. Strauss, Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit, *Experimental eye research*, 91 (2010) 630-639.
- [91] G. Bock, M. Gebhart, A. Scharinger, W. Jangsangthong, P. Busquet, C. Poggiani, S. Sartori, M.E. Mangoni, M.J. Sinnegger-Brauns, S. Herzig, J. Striessnig, A. Koschak, Functional properties of a newly identified C-terminal splice variant of Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels, *J Biol Chem*, 286 (2011) 42736-42748.
- [92] B.Z. Tan, F. Jiang, M.Y. Tan, D. Yu, H. Huang, Y. Shen, T.W. Soong, Functional characterization of alternative splicing in the C terminus of L-type CaV1.3 channels, *J Biol Chem*, 286 (2011) 42725-42735.
- [93] A. Singh, M. Gebhart, R. Fritsch, M.J. Sinnegger-Brauns, C. Poggiani, J.C. Hoda, J. Engel, C. Romanin, J. Striessnig, A. Koschak, Modulation of voltage- and Ca²⁺-dependent gating of Cav1.3 L-type calcium channels by alternative splicing of a C-terminal regulatory domain, *J Biol Chem*, 283 (2008) 20733-20744.
- [94] Y. Shen, D. Yu, H. Hiel, P. Liao, D.T. Yue, P.A. Fuchs, T.W. Soong, Alternative splicing of the Ca(v)1.3 channel IQ domain, a molecular switch for Ca²⁺-dependent inactivation within auditory hair cells, *J Neurosci*, 26 (2006) 10690-10699.

- [95] H. Huang, D. Yu, T.W. Soong, C-terminal alternative splicing of CaV1.3 channels distinctively modulates their dihydropyridine sensitivity, *Molecular pharmacology*, 84 (2013) 643-653.
- [96] O. Devuyst, P.T. Christie, P.J. Courtoy, R. Beauwens, R.V. Thakker, Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease, *Hum Mol Genet*, 8 (1999) 247-257.
- [97] W. Gunther, A. Luchow, F. Cluzeaud, A. Vandewalle, T.J. Jentsch, CLC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1998) 8075-8080.
- [98] V.A. Luyckx, F.O. Goda, D.B. Mount, T. Nishio, A. Hall, S.C. Hebert, T.G. Hammond, A.S. Yu, Intrarenal and subcellular localization of rat CLC5, *The American journal of physiology*, 275 (1998) F761-769.
- [99] K. Steinmeyer, B. Schwappach, M. Bens, A. Vandewalle, T.J. Jentsch, Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease, *J Biol Chem*, 270 (1995) 31172-31177.
- [100] M.R. Bowlby, D.A. Fadool, T.C. Holmes, I.B. Levitan, Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases, *J Gen Physiol*, 110 (1997) 601-610.
- [101] I. Chung, L.C. Schlichter, Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C, *The Journal of membrane biology*, 156 (1997) 73-85.
- [102] I. Chung, L.C. Schlichter, Regulation of native Kv1.3 channels by cAMP-dependent protein phosphorylation, *The American journal of physiology*, 273 (1997) C622-633.
- [103] S. Saxena, M. Singh, K. Engisch, M. Fukuda, S. Kaur, Rab proteins regulate epithelial sodium channel activity in colonic epithelial HT-29 cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 337 (2005) 1219-1223.
- [104] M. Gentsch, X.B. Chang, L. Cui, Y. Wu, V.V. Ozols, A. Choudhury, R.E. Pagano, J.R. Riordan, Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Molecular biology of the cell*, 15 (2004) 2684-2696.
- [105] S.K. Saxena, S. Kaur, Rab27a negatively regulates CFTR chloride channel function in colonic epithelia: involvement of the effector proteins in the regulatory mechanism, *Biochemical and biophysical research communications*, 346 (2006) 259-267.
- [106] M.R. Silvis, C.A. Bertrand, N. Ameen, F. Golin-Bisello, M.B. Butterworth, R.A. Frizzell, N.A. Bradbury, Rab11b regulates the apical recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in polarized intestinal epithelial cells, *Molecular biology of the cell*, 20 (2009) 2337-2350.
- [107] A. Swiatecka-Urban, A. Brown, S. Moreau-Marquis, J. Renuka, B. Coutermarsh, R. Barnaby, K.H. Karlson, T.R. Flotte, M. Fukuda, G.M. Langford, B.A. Stanton, The short apical membrane half-life of rescued {Delta}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Delta}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells, *J Biol Chem*, 280 (2005) 36762-36772.
- [108] J.M. Best, J.D. Foell, C.R. Buss, B.P. Delisle, R.C. Balijepalli, C.T. January, T.J. Kamp, Small GTPase Rab11b regulates degradation of surface membrane L-type Cav1.2 channels, *Am J Physiol Cell Physiol*, 300 (2011) C1023-1033.
- [109] T. Miki, S. Kiyonaka, Y. Uriu, M. De Waard, M. Wakamuri, K.P. Campbell, Y. Mori, Mutation Associated with an Autosomal Dominant Cone-Rod Dystrophy *CORD7* Modifies RIM1-Mediated Modulation of Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels, *Channels*, 1 (2014) 144-147.
- [110] D. Robinson, J. Tiedeman, Choroideremia associated with a subretinal neovascular membrane. Case report, *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 7 (1987) 70-74.
- [111] T. Tolmachova, S.T. Wavre-Shapton, A.R. Barnard, R.E. MacLaren, C.E. Fütter, M.C. Seabra, Retinal pigment epithelium defects accelerate photoreceptor degeneration in cell type-specific knockout mouse models of choroideremia, *Investigative ophthalmology & visual science*, 51 (2010) 4913-4920.

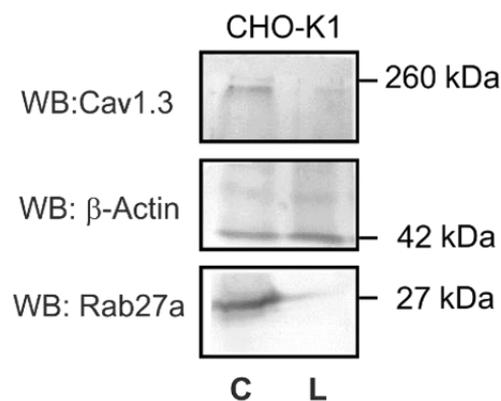
- [112] C.E. Futter, J.S. Ramalho, G.B. Jaissle, M.W. Seeliger, M.C. Seabra, The role of Rab27a in the regulation of melanosome distribution within retinal pigment epithelial cells, *Molecular biology of the cell*, 15 (2004) 2264-2275.
- [113] V.S. Lopes, J.S. Ramalho, D.M. Owen, M.O. Karl, O. Strauss, C.E. Futter, M.C. Seabra, The ternary Rab27a-Myrip-Myosin VIIa complex regulates melanosome motility in the retinal pigment epithelium, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8 (2007) 486-499.
- [114] T. Kimura, Y. Kaneko, S. Yamada, H. Ishihara, T. Senda, A. Iwamatsu, I. Niki, The GDP-dependent Rab27a effector coronin 3 controls endocytosis of secretory membrane in insulin-secreting cell lines, *Journal of cell science*, 121 (2008) 3092-3098.
- [115] T. Kimura, I. Niki, Rab27a, actin and beta-cell endocytosis, *Endocrine journal*, 58 (2011) 1-6.
- [116] T. Kimura, S. Taniguchi, I. Niki, Actin assembly controlled by GDP-Rab27a is essential for endocytosis of the insulin secretory membrane, *Arch Biochem Biophys*, 496 (2010) 33-37.
- [117] G. Raposo, M.S. Marks, D.F. Cutler, Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation, *Current opinion in cell biology*, 19 (2007) 394-401.
- [118] S. Cordeiro, S. Seyler, J. Stindl, V.M. Milenkovic, O. Strauss, Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion, *Investigative ophthalmology & visual science*, 51 (2010) 6001-6008.
- [119] N. Reichhart, S. Keckeis, F. Fried, G. Fels, O. Strauss, Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium, *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 253 (2015) 865-874.
- [120] R. Rosenthal, H. Heimann, H. Agostini, G. Martin, L.L. Hansen, O. Strauss, Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease, *Molecular vision*, 13 (2007) 443-456.
- [121] R. Rosenthal, G. Malek, N. Salomon, M. Peill-Meininghaus, L. Coeppicus, H. Wohlleben, S. Wimmers, C. Bowes Rickman, O. Strauss, The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 337 (2005) 241-247.
- [122] K. Yokoyama, H. Kaji, J. He, C. Tanaka, R. Hazama, T. Kamigaki, Y. Ku, K. Tohyama, Y. Tohyama, Rab27a negatively regulates phagocytosis by prolongation of the actin-coating stage around phagosomes, *J Biol Chem*, 286 (2011) 5375-5382.
- [123] T.S. Kuroda, H. Ariga, M. Fukuda, The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes, *Molecular and cellular biology*, 23 (2003) 5245-5255.
- [124] N.V. Palejwala, A.K. Lauer, R.G. Weleber, Choroideremia associated with choroidal neovascularization treated with intravitreal bevacizumab, *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 8 (2014) 1675-1679.
- [125] J. Campos-Pavon, J.L. Torres-Pena, Choroidal neovascularization secondary to choroideremia, *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*, 90 (2015) 289-291.
- [126] K. Endo, M. Yuzawa, N. Ohba, Choroideremia associated with subretinal neovascular membrane, *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 78 (2000) 483-486.
- [127] M. Sawa, Y. Tamaki, J.M. Klancnik, Jr., L.A. Yannuzzi, Intraretinal foveal neovascularization in choroideremia, *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 26 (2006) 585-588.
- [128] M.S. Burns, M.J. Hartz, The retinal pigment epithelium induces fenestration of endothelial cells in vivo, *Current eye research*, 11 (1992) 863-873.
- [129] K. Yu, Q. Xiao, G. Cui, A. Lee, H.C. Hartzell, The best disease-linked Cl⁻ channel hBest1 regulates Ca^v1 (L-type) Ca²⁺ channels via src-homology-binding domains, *J Neurosci*, 28 (2008) 5660-5670.
- [130] A.A. Johnson, Y.S. Lee, J.B. Stanton, K. Yu, C.H. Hartzell, L.Y. Marmorstein, A.D. Marmorstein, Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking, *Hum Mol Genet*, 22 (2013) 4688-4697.
- [131] J. Striessnig, Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels, *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 9 (1999) 242-269.

- [132] V.M. Milenkovic, E. Rohrl, B.H. Weber, O. Strauss, Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance, *Journal of cell science*, 124 (2011) 2988-2996.
- [133] B. Bakall, R.A. Radu, J.B. Stanton, J.M. Burke, B.S. McKay, C. Wadelius, R.F. Mullins, E.M. Stone, G.H. Travis, A.D. Marmorstein, Enhanced accumulation of A2E in individuals homozygous or heterozygous for mutations in BEST1 (VMD2), *Experimental eye research*, 85 (2007) 34-43.
- [134] R. Singh, W. Shen, D. Kuai, J.M. Martin, X. Guo, M.A. Smith, E.T. Perez, M.J. Phillips, J.M. Simonett, K.A. Wallace, A.D. Verhoeven, E.E. Capowski, X. Zhang, Y. Yin, P.J. Halbach, G.A. Fishman, L.S. Wright, B.R. Pattnaik, D.M. Gamm, iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration, *Hum Mol Genet*, 22 (2013) 593-607.
- [135] A.D. Marmorstein, The polarity of the retinal pigment epithelium, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2 (2001) 867-872.
- [136] D. Marchant, K. Yu, K. Bigot, O. Roche, A. Germain, D. Bonneau, V. Drouin-Garraud, D.F. Schorderet, F. Munier, D. Schmidt, P. Le Neindre, C. Marsac, M. Menasche, J.L. Dufier, R. Fischmeister, C. Hartzell, M. Abitbol, New VMD2 gene mutations identified in patients affected by Best vitelliform macular dystrophy, *Journal of medical genetics*, 44 (2007) e70.
- [137] K. Yu, Z. Qu, Y. Cui, H.C. Hartzell, Chloride channel activity of bestrophin mutants associated with mild or late-onset macular degeneration, *Investigative ophthalmology & visual science*, 48 (2007) 4694-4705.

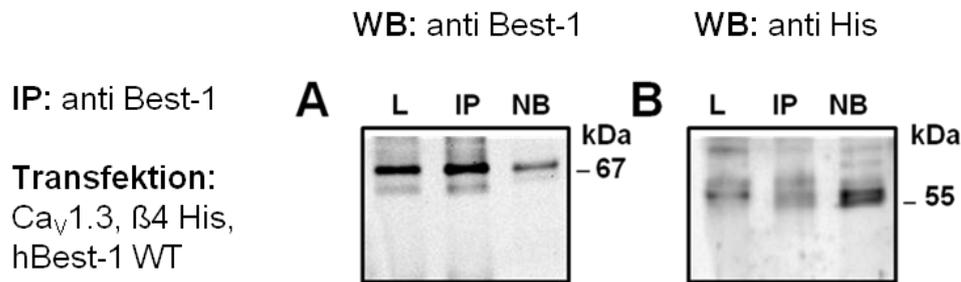
Anhang



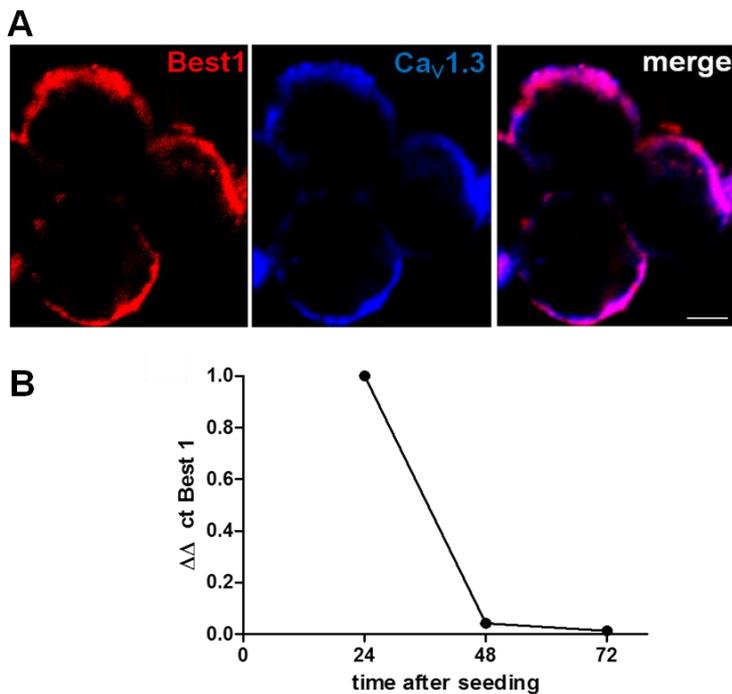
Anhang. Abbildung 1: **A:** Ba^{2+} -Ströme in CHO-K1-Zellen, die nur GFP (grün fluoreszierendes Protein) exprimieren. Gezeigt sind Depolarisationsschritte, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV bis +20 mV. Ströme zeigten keine Spannungsabhängigkeit. **B:** Der Western Blot (WB) zeigt die endogene Expression von Rab27a in ARPE-19 Zellen (L zeigt das Lysat untransfizierter ARPE-19 Zellen; die Positiv-Kontrolle C zeigt das Lysat von HEK-293-Zellen, die mit c-Myc markiertem Rab27a transfiziert wurden. [3] (Abbildung geändert nach *supplementary figure 1* nach Reichhart (2015) [3])



Anhang. Abbildung 2: Kontrolle der endogenen Expression von $Ca_v1.3$ und Rab27a in CHO-K1-Zellen. Für die Western Blots (WBs) wurde das Lysat (L) von untransfizierten CHO-K1-Zellen und von CHO-K1-Zellen, die mit Rab27a transfiziert wurden (C: Positiv-Kontrolle) transferiert und jeweils für $Ca_v1.3$, β -Aktin (Kontrolle) und Rab27a markiert. CHO-K1-Zellen zeigten endogen keine $Ca_v1.3$ und keine Rab27a-Expression. Die Proteingröße ist in kDa angegeben ($Ca_v1.3$: 250 kDa, Rab27a: 27 kDa, β -Aktin: 42 kDa).



Anhang. Abbildung 3: Koimmunpräzipitation (Co-IP) gegen Bestrophin-1 (Best-1) nach heterologer Expression in CHO-K1-Zellen. Dargestellt sind die Western Blots (WBs) der Präzipitate aus der Lysat- (L-), Koimmunpräzipitation- (IP-) und der nicht gebundenen (NB-) Fraktion, die aus lysierten CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit Ca_v1.3, β₄ His und wildtypischem (WT) hBest-1 gewonnen wurden. **A** zeigt den WB, der für Best-1 markiert wurde; **B**: zeigt den WB, der für die His-gebundene β₄-Untereinheit markiert wurde. Die Proteingröße ist in kDa angegeben (hBest-1: 67 kDa, β₄ His: 55 kDa).



Anhang. Abbildung 4: Endogene Expression von Bestrophin-1 (Best-1) und Ca_v1.3 in polarisierten primären Schweine RPE (ssRPE) Zellen. **A**: Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von untransfizierten, polarisierten ssRPE-Zellen, die immunzytochemisch für Best-1 (roter Kanal) und Ca_v1.3 (blauer Kanal) markiert wurden. Die Überlagerung der drei Kanäle (*merge*) zeigt die Kollokalisierung beider Proteine im Bereich der Zellmembran. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20 μm. **B**: Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time quantitative polymerase chain reaction (RT qPCR)) zeigt die endogene

Expression von Best-1 in ssRPE-Zellen (y-Achse) über die Zeit in Stunden (h) (x-Achse) nach der Aussaat der Zellen. Die endogene Expression von ssBest-1 erreichte nach 24 h den Maximalwert. Nach 48 h war die Expression von ssBest-1 auf 4 % der ursprünglichen Expression vorhanden, während nach 72 h die endogene Expression von ssBest-1 gleich 0 war.

Publikationsliste

Publikationen

N.Reichhart¹, **M. Markowski**^{*1}, S. Ishiyama¹, A. Wagner¹, T. Schorb, R. Föckler, J. Ramalho, M. C. Seabra, V. M. Milenkovic, O. Strauß. **Rab27a GTPase modulates L-type Ca²⁺ channel function via interaction with the II-III linker of Ca_v1.3 subunit.** *Cell Signaling*. 2015. DOI: 10.1016/j.cellsig.2015.07.023

N. Reichhart , S. Schöberl , S. Keckeis , A. AlFaar , C. Roubeix , **M. Cordes**^{*} , S. Crespo-Garcia , A. Häckel , N. Kociok , R. Föckler , G. Fels , A. Mataruga , R. Rauh , V. Milenkovic , E. Schellenberger. **Anoctamin-4 is a bona fide Ca²⁺-dependent non-selective cation channel (submitted)**

M. Cordes^{*}, (...), O. Strauß. **Mutant bestrophin-1 modulates surface expression of Ca_v1.3 channels in RPE cells. (Manuscript in process)**

Kongressbeiträge

M. Markowski^{*}, N. Reichhart, O. Strauß. **Best`s disease and the cellular behaviour of mutant bestrophin-1.** Acta Physiologica 2014; Abstracts of the 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society, Mainz, Deutschland

M. Markowski^{*}, N.Reichhart, S. Ishiyama, A. Wagner, T. Schorb, R. Föckler, J. Ramalho, M. C. Seabra, V. M. Milenkovic, O. Strauß. **Rab27a GTPase modulates L-type Ca²⁺ channel function via direct interaction with the Ca_v1.3 subunit.** Acta Physiologica 2015; Abstracts of the 94rd Annual Meeting of the German Physiological Society, Magdeburg, Deutschland

O. Strauß, N. Reichhart, S. Almedawar, P. Bucichowski, **M. Cordes**^{*}. **Inhibition of Ca²⁺ channel surface expression by mutant bestrophin-1 in RPE cells.** Abstract for the XVIIth International Symposium on Retinal Degeneration 2018, Killarney, Ireland

* Magdalena Cordes (geb. Markowski),

¹ equal contribution

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderen Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Berlin, 15.08.2018

Magdalena Cordes (geb. Markowski)