

**Untersuchungen zum Pathomechanismus von Mutationen des
humanen *BEST1*-Gens**

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie (Dr. biol.hom.)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Caroline Pasquay

Aus Eupen / Belgien

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktorin: Prof. Dr. Birgit Lorenz

Betreuer: PD Dr. Markus Preising

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuning

Disputationsdatum: 30.01.2019

Es gibt drei Wege zu Weisheit zu gelangen:

Der erste Weg ist die Nachahmung, das ist der einfachste.

Der zweite Weg ist Nachdenken, das ist der schwierigste und

der dritte Weg ist die Erfahrung, das ist der bitterste.

(Tao; China; 16.Jahrhundert)

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das menschliche Auge	1
1.2	Das Retinale Pigmentepithel (RPE).....	2
1.2.1	Transepithelialer Transport als Aufgabe des RPE	3
1.2.2	Das Elektrokulogramm (EOG)	5
1.3	Erkrankungen des RPE.....	6
1.3.1	Bestsche vitelliforme Makuladystrophie als erbliche Makuladegeneration.....	6
1.3.2	Weitere <i>hBEST1</i> assoziierte Bestrophinopathien	8
1.3.3	Phänotypische Penetranz	8
1.4	Humanes Bestrophin 1 (<i>hBEST1</i>)	9
1.4.1	Humanes <i>hBEST1</i> -Gen	9
1.4.2	Expression des humanen <i>BEST1</i> -Gens.....	9
1.4.3	Topologie und Struktur des humanen Bestrophin 1	9
1.4.4	Oligomerisierung von Bestrophin 1.....	10
1.4.5	Intrazelluläre Lokalisierung von humanem Bestrophin 1	11
1.4.6	Proteinfunktion	11
1.5	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Materialien	14
2.1.1	Humane Gewebeproben	14
2.1.2	Geräteindex.....	14
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.4	Chemikalien.....	17
2.1.5	Enzyme.....	19
2.1.6	Primer	20
2.1.7	Vektoren und Plasmide	21
2.1.8	Größenmarker	28
2.1.9	Antikörper zur Charakterisierung von Proteinen	28
2.1.10	Lösungen und Puffer	29
2.1.11	Kits und Reagenziensysteme	32

2.1.12	Eukaryotische Zelllinien und Bakterien.....	33
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Aufreinigung von Biomolekülen	35
2.2.2	Isolation von Gesamt-RNA aus Geweben.....	38
2.2.3	Reverse Transkription	38
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	39
2.2.5	Generierung eines 3'-Adenosin-Überhangs	42
2.2.6	TA-Klonierung in den pCR®2.1 TOPO®-Vektor	43
2.2.7	Dephosphorylierung von DNA-Molekülen	44
2.2.8	Ligation	44
2.2.9	Restriktionsendonukleaseverdau.....	44
2.2.10	Quantifizierung von Biomolekülen	45
2.2.11	Sequenzierung	46
2.2.12	Elektrophorese	46
2.3	Zellkulturtechnik	49
2.3.1	Bakterienkulturen	49
2.3.2	Säugetierzellkultur.....	51
2.3.3	Herstellung eines polyklonalen Antiköpers im Huhn	56
2.3.4	Aufreinigung von Proteinen über den His-Tag	56
2.3.5	Immunochemischer Nachweis definierter Proteine auf Nitrocellulosemembranen	57
2.3.6	Entparaffinieren von humanen Retinaschnitten	58
2.3.7	Immunhistochemische Färbungen.....	58
3	Ergebnisse.....	62
3.1	Klonierung des hBEST1-Gens.....	62
3.1.1	Amplifikation des hBEST1-Gen-Transkriptes	62
3.1.2	TOPO-TA-Klonierung des <i>hBEST1</i> -Gens	62
3.1.3	Klonierung des <i>hBEST1</i> -Gens in den pCDNA3.1(+) Vektor	65
3.1.4	Einführen der Mutationen in das pC3(+)-hBEST1-His-Plasmid.....	67
3.1.5	Klonierung des <i>hBEST1</i> -Gens in den pCDNA™5/FRT-Vektor.....	68
3.2	Charakterisierung eines N-terminalen anti-Bestrophin 1-Antikörpers.....	69
3.3	Darstellung der intrazellulären Lokalisation von transient transfizierten <i>hBEST1</i> - Mutationen in der MDCK-II-Zelllinie	72
3.4	Interaktion des Bestrophin 1-Wildtypproteins mit mutiertem Bestrophin 1	76
3.4.1	Generierung einer MDCK-II-Flip-In Zelllinie	76
3.4.2	Stabile Transfektion der MDCK-II-Flip-In-Zelllinie mit <i>hBEST1</i> -MYC	77

3.4.3	Darstellung der Interaktion des Wildtyp-Genproduktes mit mutiertem Bestrophin	
1	80	
3.4.4	Darstellung der Interaktion von mutierten und nicht mutierten <i>hBEST1</i> -Genprodukten über den His-Tag	84
3.4.5	Immunhistochemischer Nachweis der Interaktion der mutierten <i>hBEST1</i> -Genprodukte in MDCK-II-Best-Zellen	87
4	Diskussion	91
4.1	Untersuchung der Expression und Lokalisation der <i>hBEST1</i> -Genprodukte in MDCK-II-Zellen	92
4.2	Untersuchung zur Interaktion der <i>hBEST1</i> -Genprodukte in MDCK-II-Best-Zellen.	95
4.3	Untersuchung der Expression und Lokalisation der <i>hBEST1</i> -Genprodukte in MDCK-II-Best-Zellen	96
4.4	Schlussfolgerung.....	99
4.5	Ausblick	99
5	Zusammenfassung.....	101
6	Summary	103
7	Abkürzungsverzeichnis	105
8	Abbildungsverzeichnis	108
9	Tabellenverzeichnis.....	110
10	Literaturverzeichnis	111
11	Danksagung	118
12	Eidesstattliche Erklärung.....	119

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Auge

Der Mensch nimmt seine Umwelt über die Sinnesorgane wahr, wobei die Augen eine zentrale Rolle spielen, da sie die Orientierung im Raum ermöglichen. Das Auge mit seinen ca. 130 Millionen Photorezeptoren ermöglicht die Wahrnehmung von elektromagnetischer Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts zwischen 380 nm und 700 nm Wellenlänge (Schwegler, 1998). Es ist in drei Schichten aufgebaut (Abbildung 1-1A). Die äußere Schicht bilden die Lederhaut (Sclera) und die Hornhaut (Cornea). Die mittlere Schicht bildet die Aderhaut (Choroidea) inklusive Ziliarkörper und Iris und die innere Schicht wird durch die dreischichtige neuronale Retina repräsentiert (Abbildung 1-1B). Die neuronale Retina wird durch das retinale Pigmentepithel zur Choroidea hin begrenzt (Abbildung 1-1B).

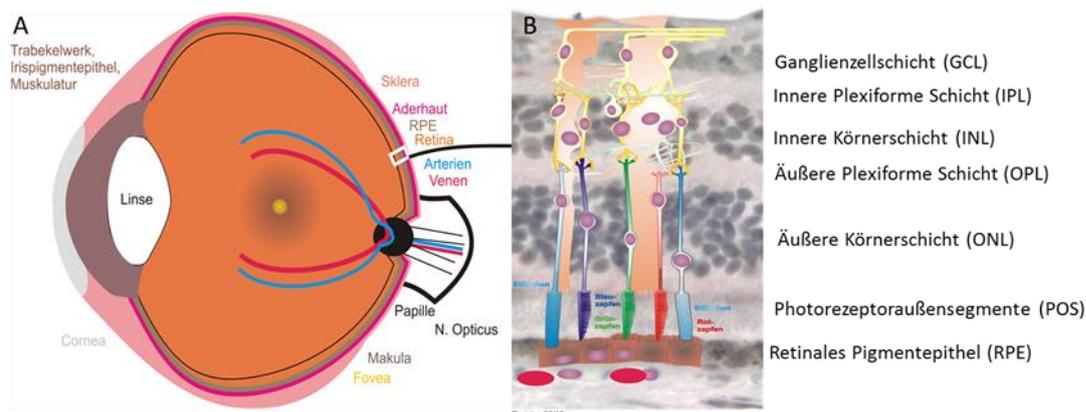


Abbildung 1-1: Aufbau des menschlichen Auges und der Retina.

A) zeigt ein Querschnittsdiagramm durch das menschliche Auge. B) zeigt eine schematische Darstellung der Retina. RPE: Retinales Pigmentepithel; POS: Photorezeptoraußensegmente; ONL: Äußere Körnerschicht; OPL: Äußere Plexiforme Schicht; INL: Innere Körnerschicht; IPL: Innere Plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. (Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Markus Preising)

In der Retina wandeln die lichtsensitiven Sinneszellen, die Photorezeptoren, die Lichtreize in eine Hyperpolarisation der Photorezeptormembran um (Abbildung 1-1B). Diese Hyperpolarisation der Membran wird über die synaptische Verschaltung mit Interneuronen (Horizontalzellen, Bipolarzellen und Amakrinzellen) in der äußeren plexiformen Schicht (OPL), der inneren Körnerschicht (INL) und in der inneren plexiformen Schicht (IPL) zu den Ganglienzellen (GCL) weitergeleitet, deren Axone den Sehnerv bilden (Abbildung 1-1B). Dieser leitet die Signale in den optischen Cortex weiter, wo es zur visuellen Wahrnehmung kommt.

Die menschliche Retina verfügt über zwei Typen von Photorezeptoren, Zapfen und Stäbchen. Die ca. 120 Millionen Stäbchen ermöglichen das skotopische Sehen in der Dämmerung und

bei Nacht. Die ca. 6 Millionen Zapfen sind dagegen für das photopische Sehen bei Tag zuständig (Schwegler, 1998). Innerhalb der Retina liegt eine asymmetrische Verteilung von Stäbchen und Zapfen vor. Während die Stäbchen über die gesamte Retina außer der Sehnervenscheide und am Rand der Makula verteilt liegen, befinden sich die Zapfen im zentralen Bereich der Retina, der Makula. Ihre höchste Dichte findet man in der Fovea. Dieser Bereich hat einen Durchmesser von ca. 5,5 mm und weist mit ca. 150.000 Photorezeptoren/mm² eine erhöhte räumliche Dichte auf. Dieses Areal wird als gelber Fleck oder Makula lutea (siehe Abbildung 1-2) bezeichnet und ist verantwortlich für das Farbsehen und die gute optische Auflösung im zentralen Gesichtsfeld mit der Fovea als Ort des schärfsten Sehens. Die in Abbildung 1-2 ebenfalls gezeigte Papille stellt die Austrittsstelle des Sehnervs dar.

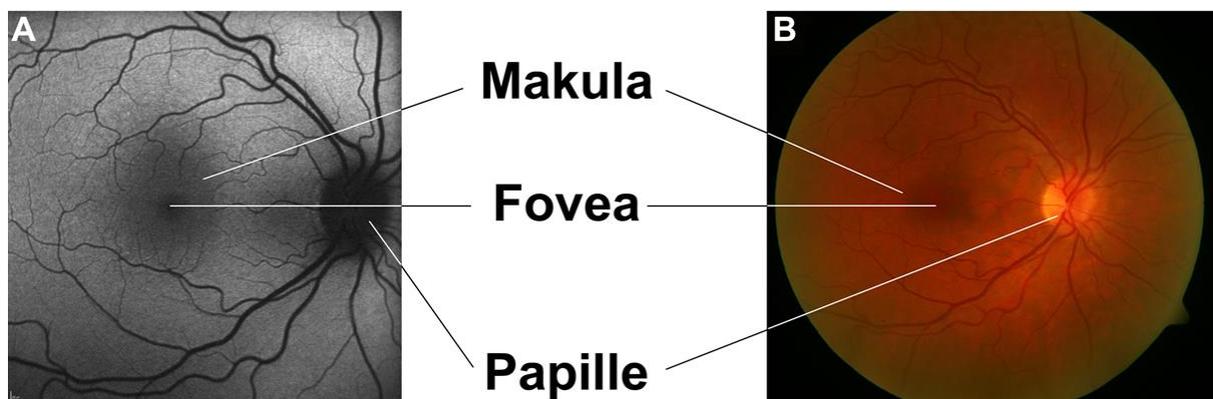


Abbildung 1-2: Darstellung des Augenhintergrundes durch eine Autofluoreszenz- und eine Fundusaufnahme eines Normprobanden.

In A) ist die Verteilung der Autofluoreszenz des gesunden Augenhintergrundes gezeigt. In B) ist eine Fundusfotografie eines Normprobanden zu sehen. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Birgit Lorenz)

1.2 Das Retinale Pigmentepithel (RPE)

Das retinale Pigmentepithel (RPE) wird von einer einschichtigen Lage hexagonaler, pigmentierter Epithelzellen gebildet. Die Zellen sind über tight junctions miteinander verbunden und stellen die äußerste Schicht der Blut-Retina-Schranke dar. Die Photorezeptoren sind mit ihren äußeren Segmenten zwischen den Mikrovilli des RPE eingebettet (Abbildung 1-1B).

Bedingt durch die sehr engen Zell-Zellkontakte zwischen den einzelnen RPE-Zellen und der Ausbildung von Mikrovilli können die RPE-Zellen ihre Aufgaben erfüllen. Diese bestehen in der Lichtabsorption, dem kontrollierten transepithelialen Transport, dem Ionentransport, dem Recycling der Photopigmente, der Phagozytose der abgestoßenen äußeren Segmente der Photorezeptoren, im Abtransport von Stoffwechselprodukten der Photorezeptoren durch die Bruch'sche Membran, der Sekretion und der Immunmodulierung (Marmorstein et al., 2007, LaVail, 1983, Nguyen-Legros J, 2000). Außerdem unterdrückt die starke Pigmentierung der

Zellen die Bildung von Streulicht. Molekulare Untersuchungen am RPE sind von großem Interesse, da Funktionsstörungen im RPE als Ursache für einige retinale Degenerationen identifiziert werden konnten.

Da die Pathologie der in dieser Studie untersuchten Erkrankung, auf die später noch genauer eingegangen wird, auf einem gestörten Chloridionenstrom im RPE beruht, wird auf den transepithelialen Transport und den Ionenstrom im Folgenden noch vertieft eingegangen.

1.2.1 Transepithelialer Transport als Aufgabe des RPE

Bedingt durch ihre Struktur, sind RPE-Zellen in der Lage, Wasser und Ionen durch aktiven Transport von der apikalen Seite zur basolateralen Seite zu transportieren (siehe Abbildung 1-3A). Die Zellen stehen über Querverbindungen, den tight junctions, in sehr enger Verbindung zueinander, was den Zellen erlaubt, miteinander zu kommunizieren (Gallemore et al., 1997). Des Weiteren zeigen die RPE-Zellen eine Polarisierung von apikal zu basolateral, was in der Expression unterschiedlicher Membranproteine und der Verteilung der Organellen Ausdruck findet (Bok D., 1993). Die asymmetrische Verteilung der Membranproteine stellt den Transport von Wasser, Ionen (siehe Abbildung 1-3-A) und Metaboliten vom subretinalen Raum zum Choroid und den Transport von Glukose und anderen Nährstoffen, wie z.B. Fettsäuren, aus dem Blutstrom zu den Photorezeptoren hin sicher (siehe Abbildung 1-3 und 1-4; Strauss, 2005).

Der Wassertransport erfolgt größtenteils über die transzelluläre Route. Dafür exprimieren die RPE-Zellen Aquaporin-1 an der apikalen und basalen Membran (Hamann et al., 1998).

Der apikale Transport wird über die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ gesteuert (Strauss, 2005; Hu JG et al., 1994). Diese Pumpe generiert den Gradienten für die Aufnahme von Cl^- und K^+ -Ionen durch den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Cotransporter (Strauss, 2005), was zu einer hohen Konzentration von Cl^- -Ionen in der Zelle führt (Miller SS et al., 1991). Die Cl^- -Ionen können die Zellen über Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle, den ClC-2 -Kanal und/oder den CFTR -Kanal verlassen (Strauss, 2005, Bosl MR et al., 2001, Blaug S et al., 2003). Die Regulierung des pH-Wertes erfolgt über die kombinierte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporters in der apikalen Membran und dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter in der basolateralen Membran (Strauss, 2005).

Der Transport von Retinol zwischen Photorezeptoren und Blutstrom wird ebenfalls über die RPE-Zellen geregelt (Strauss, 2005). Diese Funktion ist sehr wichtig, da sie direkt mit dem visuellen Zyklus in Verbindung steht (Baehr et al., 2003). Der Transport von Glukose im RPE ist passiv und wird über die Glukosetransporter Glut-1 und Glut-3, die in der apikalen und basolateralen Membran lokalisiert sind, geregelt (Strauss, 2005, Ban Y et al., 2000).

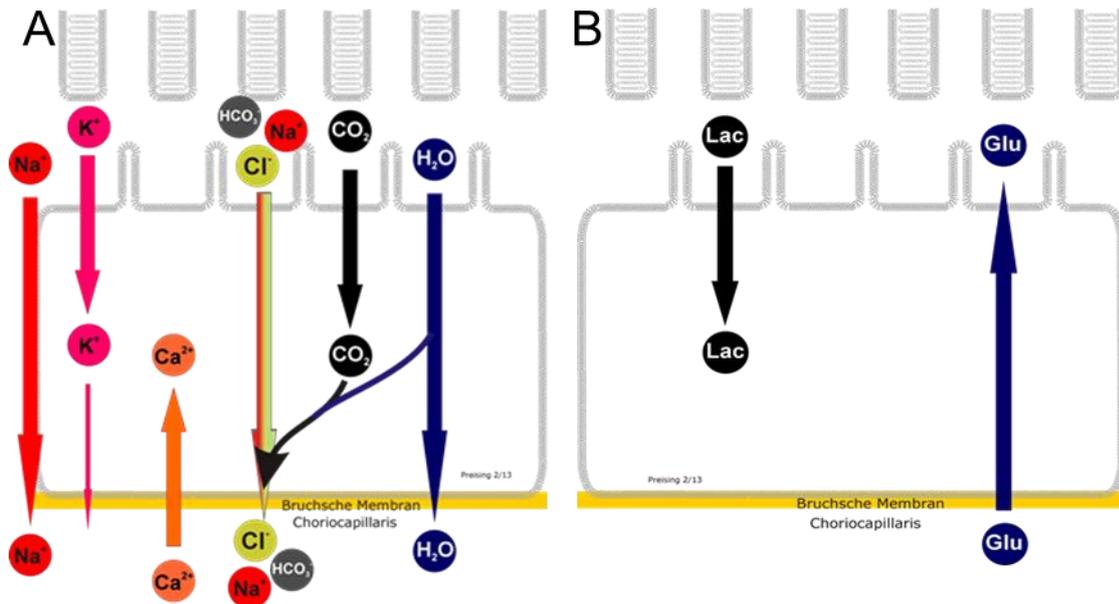


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Ionen- und Nährstofftransportes im RPE.

A) Darstellung des Ionentransportes im RPE. B) Darstellung des Nährstofftransportes im RPE. Lac: Laktat, das als Stoffwechselmetabolit von den Photorezeptoren abtransportiert wird. Glu: Glukose, die aus dem Blutstrom der Choriocapillaris aufgenommen und zu den Photorezeptoren transportiert wird. (Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Markus Preisling)

Die lichtabhängigen Änderungen der Photorezeptoraktivität führen zu schnellen Wechseln der Ionenzusammensetzung im subretinalen Spalt, was eine schnelle Kompensation durch das RPE erfordert (Steinberg RH et al., 2003). Der normale transepitheliale Transport wäre für diese schnellen Wechsel zu langsam, da durch die Dauerreizung der Photorezeptoren die Na^+/K^+ -ATPase in der apikalen Membran alleine nicht in der Lage wäre, den für eine erneute Hyperpolarisation benötigten Ionengradienten in derart kurzer Zeit wieder herzustellen. Diese Verzögerung hätte einen kurzfristigen Ausfall der Reizweiterleitung zur Folge. Daher hat das RPE zwei Mechanismen zur Kompensation entwickelt. Ein Mechanismus hängt mit der Verringerung der Kaliumkonzentration im subretinalen Spalt während der lichtabhängigen Aktivierung der Photorezeptoren zusammen. Die Verringerung der Kaliumkonzentration hyperpolarisiert die apikale Membran der RPE-Zellen (Strauss, 2005). Dies führt zur Aktivierung von einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen, die einen Ausfluss von Kalium zurück in den subretinalen Spalt bewirken (Strauss, 2005). Ein weiterer Mechanismus kompensiert die Volumenänderungen im subretinalen Spalt (Strauss, 2005). Diese Kompensation basiert auf der Aktivität des apikalen, spannungsabhängigen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporters (La Cour M, 1991). Die lichtbedingte Hyperpolarisation der apikalen Membran verringert die Aktivität dieses Cotransporters. Dies wiederum führt zu einer Ansäuerung des Zellinneren, was einen Ausfluss von Chloridionen und später den Einstrom von Wasser zur Folge hat (Strauss, 2005).

1.2.2 Das Elektrookulogramm (EOG)

Das Elektrookulogramm (EOG, siehe Abbildung 1-4) ist ein elektrophysiologischer Test für das RPE. Es misst die Änderung des elektrischen Potentials zwischen Cornea und Augenhintergrund beim Lichtwechsel (Brown et al., 2006). Dieses Potential wird hauptsächlich vom RPE generiert und verändert sich bei Lichteinstrahlung.

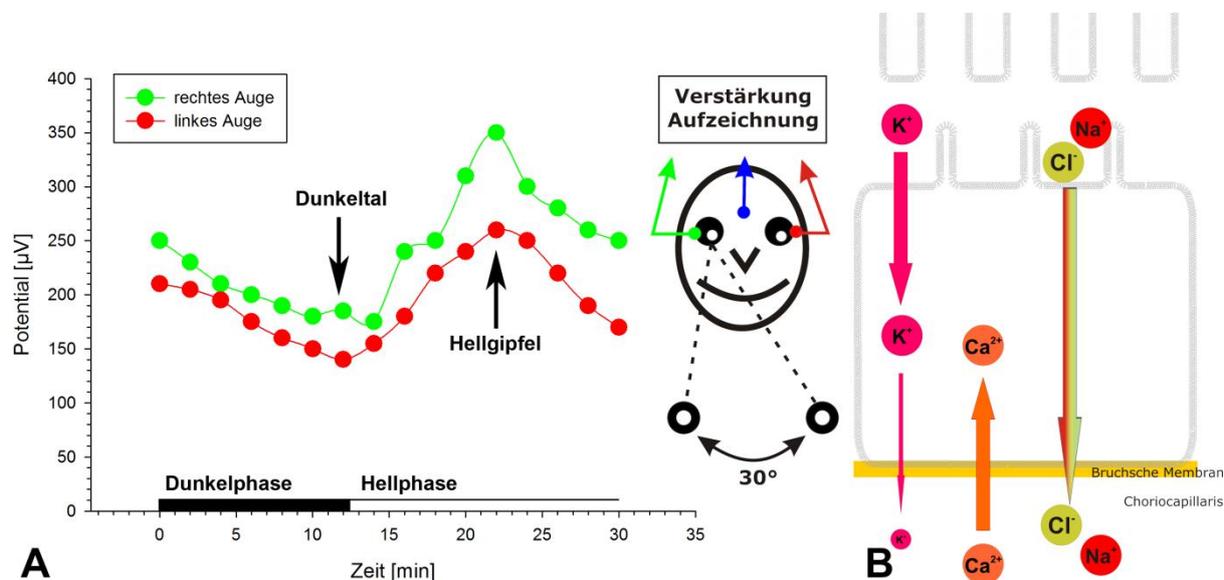


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung eines EOG.

In A) wird der Aufbau und Verlauf des transretinalen Potentials während einer EOG-Messung dargestellt. In B) wird die mittels des EOG gemessene Ionenverteilung abgebildet.

Blauer Pfeil: Referenzelektrode, grüner/roter Pfeil: Meßelektrode für das rechte (rot) und linke (grün) Auge mit den entsprechend farbig markierten Potentialbeispielen. (Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Markus Preisig)

Das Potential sinkt nach acht bis zehn Minuten in der Dunkelheit auf ein Minimum. Anschließende Lichteinstrahlung führt zu einem langsamen Ansteigen des Ruhepotentials bis zu einem Maximum auf dem das Potential dann bleibt (Hellgipfel). Dieses Phänomen wird als Light-peak bezeichnet und hat seine Ursache im Anstieg des Chloridionenstroms über der Basalmembran des RPE (Brown et al., 2006). Das Verhältnis von Hellgipfel und Dunkeltal findet im Arden-Quotient Ausdruck, der einen Quotienten aus der Hellgipfelamplitude und der Dunkeltal-Amplitude darstellt (Arden et al., 1962). Generell zeigen M. Best Patienten keinen Hellanstieg im EOG (Boon et al., 2009). Das abnormale EOG wird als charakteristisches Diagnosemerkmal für M. Best Patienten gewertet (Deutman AF, 1969). Obwohl fast alle Patienten dieses Charakteristikum teilen, gibt es Studien, die zeigen, dass das EOG in den ersten Stadien auch bei klinisch Betroffenen normal sein kann (Wabbels et al., 2006, Pollack K et al., 2005).

1.3 Erkrankungen des RPE

Störungen der RPE-Funktion führen zu retinalen Degenerationen, da die enge Interaktion zwischen RPE und Photorezeptoren eine funktionelle Einheit bildet (Strauss, 2005). Mutationen in Genen, die in den Photorezeptoren exprimiert werden, können zu einer primären Beeinträchtigung der RPE-Funktion führen (z.B. bei Mutationen des *ABCA4*-Gens) und im zweiten Schritt zum Verlust der Photorezeptoren (Weng J et al., 1999). Andererseits können Mutationen, die in Genen des RPE exprimiert werden, retinale Degenerationen wie z.B. Chorioideremie und die Bestsche vitelliforme Makuladystrophie (VMD) hervorrufen (Strauss, 2005).

1.3.1 Die juvenile vitelliforme Makuladystrophie nach Best als erbliche Makuladegeneration

Die Bestsche vitelliforme Makuladystrophie (VMD, OMIM #153700) ist eine autosomal dominant vererbte im Jugendalter beginnende Makuladegeneration. Sie wurde im Jahre 1905 erstmals von dem deutschen Augenarzt Friedrich Best in Familien aus dem Raum Gießen beschrieben (Best, 1905). Der Beginn der Erkrankung ist variabel und reicht vom ersten Lebensjahrzehnt bis zur sechsten Lebensdekade (Wabbels et al., 2006). Ein Hauptsymptom ist die Verringerung der Sehschärfe, es können aber auch andere Symptome wie Photophobie, Nachtblindheit, Farbsinnstörungen, Metamorphopsien (Verzerrtsehen) sowie ein zentraler Gesichtsfeldausfall auftreten. Eine vollständige Erblindung bleibt aber aus, da sich die Erkrankung nur über den Bereich der Makula erstreckt und die Peripherie nicht betroffen ist, was den Patienten die Orientierung ermöglicht (Wabbels et al., 2006). Die Erkrankung kann beide Augen oder auch nur ein Auge betreffen. Charakteristisch ist zu Beginn eine große eidotterförmige Veränderung im Bereich der Makula (Gass JMD, 1997; siehe Abbildung 1-5B). Die Erkrankung kann anhand der ophthalmoskopischen Aspekte in verschiedene Stadien eingeteilt werden (Gass, JMD, 1997):

Stadium 1 (prävitelliformes Stadium): normale Fovea (siehe Abbildung 1-5A), aber mit abnormalem Elektrokulogramm (EOG).

Stadium 2 (vitelliformes Stadium): eidotterförmige Läsion im Bereich der Makula (siehe Abbildung 1-5B).

Stadium 3 (Pseudohypopyon Stadium): Weiterentwicklung des vitelliformen Stadiums, bei der die Läsion scheinbar gerissen ist und das Material sich in den subretinalen Spalt zu ergießen scheint (siehe Abbildung 1-5C).

Stadium 4 (vitelliruptives Stadium, „Rührei“-Stadium): ungleichmäßige Verteilung des gelblichen Materials mit ausfransender Begrenzung (siehe Abbildung 1-5D).

Stadium 5 (fibrotisches Stadium): Atrophierte Makula und subretinales, faseriges Gewebe im Bereich der Makula (siehe Abbildung 1-5E).

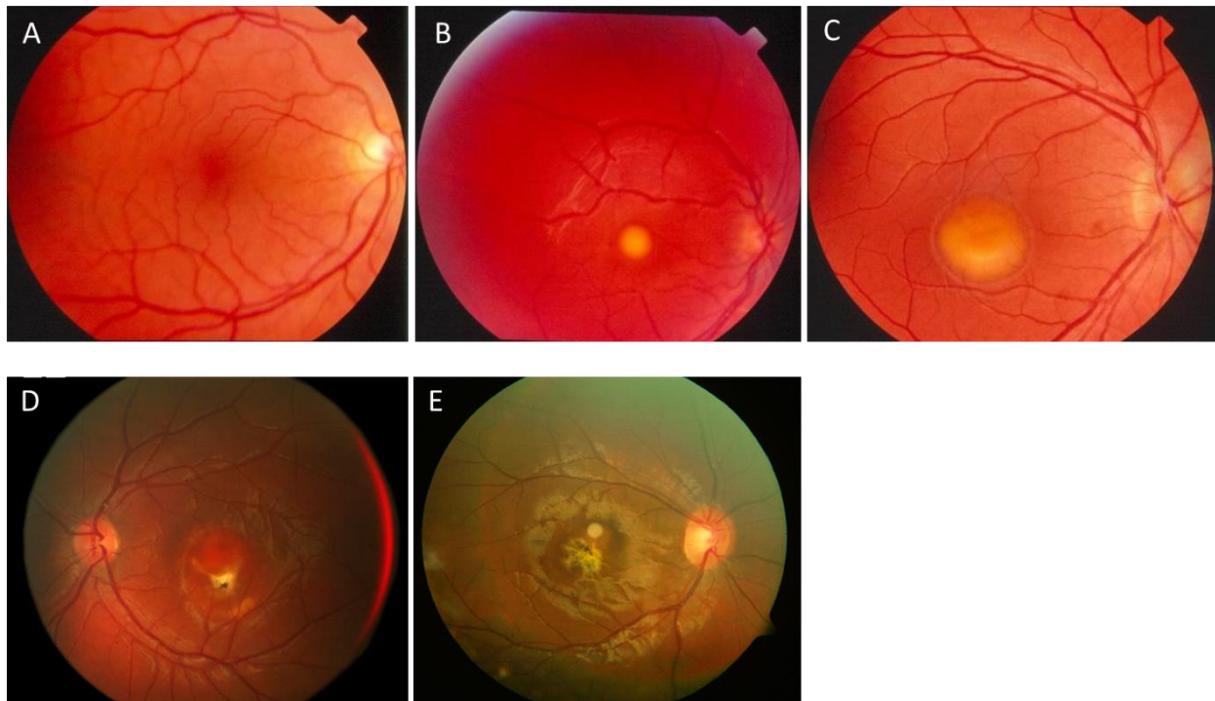


Abbildung 1-5: Funduskopische Abbildungen der verschiedenen Stadien der VMD

nach Gass.(Gass, 1987)

A: prävitelliformes Stadium; B: vitelliformes Stadium; C: Pseudohypopion Stadium; D: vitelliruptives Stadium und E: fibrotisches Stadium. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof.Dr. Birgit Lorenz)

1.3.2 Weitere *hBEST1* assoziierte Bestrophinopathien

Bislang konnten über 250 krankheitsverursachende Mutationen im *hBEST1*-Gen identifiziert werden (Pasquay C et al., 2013). 75 % der veröffentlichten Fälle sind klinisch dem M. Best zuzuordnen (OMIM: #153700). Die restlichen 25% der Mutationen sind mit weiteren Bestrophinopathien assoziiert, der adulten vitelliformen Makuladystrophie (AVMD, OMIM: #608161) (Krämer et al., 2000), der autosomal dominanten Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC, OMIM: #193220) (Yardley et al., 2004; Burgess et al., 2009), der autosomal rezessiven Bestrophinopathie (ARB, OMIM: #611809) (Davidson et al., 2011; Burgess et al., 2008) und spätmanifestierenden Formen, die mit der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD, OMIM: #603075) in Bezug gesetzt wurden (Marquardt et al., 1998, Krämer et al., 2000). Das Mutationsspektrum der mit dem *hBEST1*-Gen assoziierten Erkrankungen besteht überwiegend aus Missensmutationen (>93%), die sich im konservierten N-Terminus, der aus den Aminosäuren (AS) 1-325 des Proteins besteht, befinden.

1.3.3 Phänotypische Penetranz

In der Genetik versteht man unter Penetranz die prozentuale Wahrscheinlichkeit, mit der ein Genotyp zu dem dazu gehörigen Phänotyp führt. Dabei werden zwei Möglichkeiten unterschieden; einmal die vollständige Penetranz, bei der es immer zur Ausprägung des Merkmals kommt und die unvollständige Penetranz, bei der sich trotz des vorliegenden Genotyps kein pathologischer Phänotyp manifestiert. Die genauen Hintergründe der reduzierten Penetranz sind nach wie vor ungeklärt. Es können jedoch modifizierende Einflüsse anderer Gene, die Funktion des Genproduktes oder Umwelteinflüsse eine Rolle spielen (Wilhelm Seyffert, 2003).

Die reduzierte Penetranz darf jedoch nicht mit der Expressivität verwechselt werden. Unter dem Begriff der Expressivität versteht man den Grad der Ausprägung eines Merkmals (Wilhelm Seyffert, 2003).

Bei Patienten mit einer Bestrophinopathie kann die genetische Penetranz soweit reduziert sein, dass bei heterozygoten Mutationsträgern die Erkrankung niemals zum Ausbruch kommt. Des Weiteren ist bei Bestrophinopathien zu beobachten, dass die Erkrankung in beiden Augen eines Patienten unterschiedlich verlaufen kann (Wabbels et al., 2006), was auf variable Expression hindeutet. Die Ursachen für die variable Expression sind bislang nicht bekannt.

1.4 Humanes Bestrophin 1 (*hBEST1*)

1.4.1 Humanes *hBEST1*-Gen

Das humane *hBEST1*-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q13) und erstreckt sich über 11,5 kb genomische DNA. Von den 11 Exonen kodieren die Exone zwei bis elf für ein 585 AS langes integrales Membranprotein, das Bestrophin-1. Zu der Genfamilie der Bestrophine gehören beim Menschen drei weitere Paraloge, nämlich BEST2, BEST3 und BEST4.

1.4.2 Expression des humanen *BEST1*-Gens

Mittels quantitativer PCR konnte eine gewebespezifische Expression von *hBEST1*-mRNA nachgewiesen werden. Die Analyse von 20 menschlichen Geweben zeigte mRNA Expression von *hBEST1* im RPE und schwach im Hoden (Stöhr H et al., 2002). Auch in den epithelialen Geweben der Atemwege und in einigen humanen Zelllinien wurde Bestrophin 1 nachgewiesen (René Barro-Soria et al., 2008, Aldehni F et al., 2009, Spitzner M et al., 2008, Duta et al., 2004). Interessanterweise führt die Expression von mutiertem *hBEST1* außerhalb des RPE bei Bestrophinopathiepatienten zu keinen weiteren Pathologien.

1.4.3 Topologie und Struktur des humanen Bestrophin 1

Da durch das Vergleichen der Aminosäuresequenz keine Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion festgestellt werden konnte, wurde versucht, die Struktur und Topologie von Bestrophin 1 *in silico* und *in vitro* zu bestimmen. Während der N-Terminus, bestehend aus den ersten 325 AS innerhalb der verschiedenen Arten hochkonserviert ist, ist der C-Terminus hoch variabel. Basierend auf *in silico* Hydrophobizitätsanalysen wurde ein Topologiemodell für Bestrophin 1 mit fünf bis sechs hydrophoben Transmembrandomänen (TMDs, Abbildung 1-6) vorgeschlagen, die im Folgenden mit TMD1-6 bezeichnet werden. Durch zellkulturgestützte Analysen der Topologie durch Einführen von N-Glykosylierungsstellen und Tobacco Etch Virus-Protease (TEV)-Schnittstellen, wurde ein Topologiemodell mit vier TMDs, die die Membran durchspannen vorgeschlagen (Tsunenari et al., 2003). In einem unabhängigen Versuchsansatz, basierend auf der Analyse der Integrationsfähigkeit von *in vitro* translatierten Bestrophin 1-TMD-Sequenzabschnitten in die Membran von Mikrosomen, wurde das Modell mit vier TMDs bevorzugt (Milenkovic et al., 2007). In dieser Arbeit wurde das von Tsunenari et al. vorgeschlagene Topologiemodell bevorzugt (Tsunenari et al., 2003), da das Einbringen von Glykosylierungsstellen weniger störende Effekte auf das Protein hat, als einzelne TMD's unabhängig vom Gesamtprotein auf ihre Integrationsfähigkeit in einer Membran zu untersuchen.

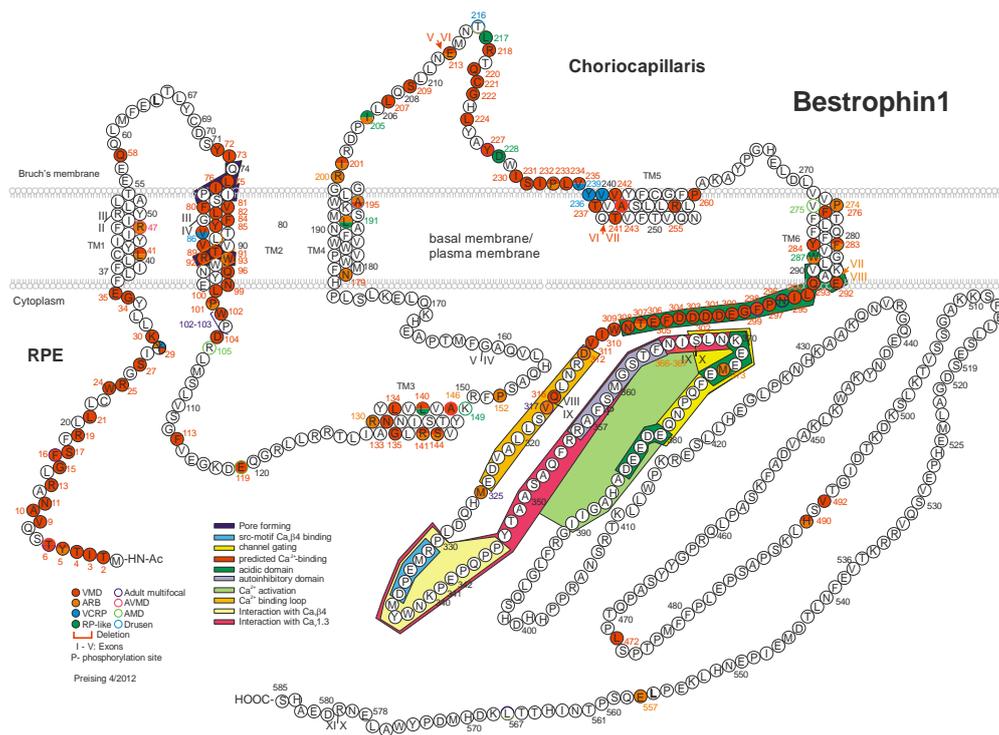


Abbildung 1-6: Modell der Topologie von humanem Bestrophin 1.

Gezeigt werden die Transmembrandomänen und die bisher identifizierten Strukturen und Mutationspositionen, Farbcodierung und funktionelle Bereiche siehe Legende in der Abbildung (Pasquay et al., 2013).

1.4.4 Oligomerisierung von Bestrophin 1

Die Analyse der Stöchiometrie von in HEK-293 Zellen heterolog exprimiertem und immunpräzipitiertem Bestrophin 1 wies auf eine Quartärstruktur aus vier bis fünf Bestrophin 1-Untereinheiten (UE) hin (Sun et al., 2002). In einer weiteren Studie dagegen konnte mit nativem porcinem Bestrophin 1 eine Dimerformation gezeigt werden (Stanton et al., 2006). Hierzu wurden RPE-Zellen aus Schweineaugen isoliert und das Bestrophin-1 mittels des Detergenz Triton X-100 solubilisiert. Anschließend wurde die Stöchiometrie nach einer Immunpräzipitation durch Zentrifugationssedimentierung und SDS-PAGE bestimmt (Stanton et al., 2006.). Die genauen molekularen Mechanismen der Oligomerisierung von Bestrophin 1-UE wurden bislang noch nicht adressiert. Auch die Rolle von patientenbezogenen *hBEST1* Mutationen im Kontext der Oligomerisierung wurde bislang noch nicht näher untersucht.

1.4.5 Intrazelluläre Lokalisierung von humanem Bestrophin 1

Für heterolog exprimiertes Bestrophin 1 konnte eine Lokalisation an der Plasmamembran festgestellt werden. Für natives Bestrophin 1 liegen im Gegenzug bisher nur spärliche Daten vor. Immunfluoreszenzfärbungen an Schweine- und Makakenaugen zeigten, dass die Bestrophin 1-Expression auf das RPE beschränkt ist. Höhere Vergrößerungen dieser Präparate wiesen auf eine Expression an der basolateralen Plasmamembran des RPE hin (A. D. Marmorstein et al., 2000). Eine weitere Studie wies eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nach (Strauss et al., 2012). Auch mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten bisher noch keine endgültigen Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation von Bestrophin 1 getroffen werden.

1.4.6 Proteinfunktion

Bedingt durch die fehlende Homologie der Bestrophine zu bereits charakterisierten Proteinen konnten bislang keine direkten Rückschlüsse auf die Proteinfunktion gezogen werden. In einer Studie wurde zunächst eine kalziumabhängige Chloridionenkanalfunktion für Bestrophin 1 vorgeschlagen (Sun et al., 2002). Diese Annahme wurde durch weitere Studien unterstützt, in denen einzelne AS mutiert wurden und so der Chloridionenkanal definiert werden konnte (Qu et al., 2004). Insbesondere konnten hierüber einzelne AS definiert werden, die an der Porenbildung und Ionenselektivität des Kanals beteiligt sind (Qu et al., 2004). Die Hypothese, dass es sich bei Bestrophin 1 um einen Chloridionenkanal handelt, basiert auf dem reduzierten Hellgipfel im Elektrokulogramm (EOG) von Bestrophinopathie-Patienten und auf der Beobachtung, dass der Hellgipfel durch den Chloridionenstrom über der basolateralen Membran des RPE entsteht. Des Weiteren ist der Chloridionenfluss kalziumabhängig. Eine alternative Funktion schreibt dem Bestrophin 1 eine indirekte Beteiligung an der Entstehung des Hellgipfels zu. Dies legte eine Studie nahe, die ein knock out Mausmodell für Bestrophin 1 untersuchte, das keinen Phänotyp im Auge zeigte, jedoch einen Einfluss von Bestrophin 1 auf andere Ionenkanäle im RPE, möglicherweise über intrazelluläre Kalziumspeicher, nahelegte (A. D. Marmorstein & Marmorstein, 2007). Vor diesem Hintergrund wurden schließlich mehrere mögliche Interaktionspartner von Bestrophin 1 identifiziert, nämlich die β_4 Untereinheit (*CACNB4*) des spannungsabhängigen Calciumkanals $Ca_v1.3$ (*CACNA1D*) (Yu et al., 2007, Reichhart et al., 2010) und die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (*PP2Ac*) (Marmorstein LY. et al., 2002).

Um die Frage zu klären, ob Bestrophin 1 den eigentlichen Ionenkanal darstellt, wurden elektrophysiologische Untersuchungen in Anwesenheit von Bestrophin 1 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten deutlich, dass Adenosintriphosphat (ATP) einen Chloridionenstrom an der basolateralen Membran von Zellen, die Bestrophin 1 exprimieren,

freisetzt. Dieser Ionenstrom findet nicht statt oder ist reduziert, wenn kein Bestrophin 1 exprimiert wird. Allerdings ist er mutationsspezifisch deutlich erhöht, wenn entsprechende *hBEST1*-Mutationen exprimiert werden (Marmorstein LY et al., 2006).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel des Projektes war es, den Pathomechanismus von drei häufigen Bestrophin 1-Mutationen mit reduzierter Penetranz zu untersuchen. Dazu wurden zwei Missense-Mutationen (p.D312N und p.N99K) sowie eine Deletionsmutation (p.I295del) im humanen *hBEST1* Gen untersucht. Bei der Missense-Mutation p.D312N ist an Position 312 im Protein die Aminosäure Asparat gegen Asparagin ausgetauscht, was zu einem Verlust an negativer Ladung führt. Die Mutation stellt einen Polymorphismus dar (Davidson et al., 2009). Als Polymorphismus bezeichnet man in der Genetik das Auftreten von Sequenzvariationen, die nicht zu einer effektiven Funktionsänderung des Genproduktes führen.

Bei der Missense-Mutation p.N99K ist an Position 99 im Protein die Aminosäure Asparagin gegen Lysin ausgetauscht, was zu einer Zunahme an positiver Ladung führt. Die Mutation zeigt reduzierte Penetranz und variable Expressivität (Wabbels et al., 2006).

Bei der Deletionsmutation p.I295del fehlt an Position 295 die ungeladene Aminosäure Isoleucin. Die Mutation ist eine *in-frame* Mutation, d.h. sie führt nicht zu einer Verschiebung des Leserasters. Auch diese Mutation zeigt reduzierte Penetranz und variable Expressivität (Wabbels et al., 2006).

Die Mutationen liegen bei Patienten mit M. Best heterozygot vor. Über eine Interaktionsstudie sollte geprüft werden, ob die mutierten Untereinheiten des Bestrophin 1 mit den Wildtypuntereinheiten interagieren.

Dafür wurde zunächst die Expression und zelluläre Lokalisation der Mutationen p.D312N, p.N99K und p.I295del überprüft. Die Mutationen p.N99K und p.I295del wurden ausgewählt, da eine Patientengruppe, die Träger dieser Mutationen ist, in der Augenklinik Gießen untersucht und beschrieben wurde. Die p.D312N Mutation wurde bereits beschrieben und diente zur Kontrolle, da die Mutation einen Polymorphismus darstellt, der zu keiner Veränderung des Phänotyps führt.

Um die Wildtyp-DNA zu erhalten, wurde zunächst das *hBEST1* Wildtyp (WT) Gen aus der Gesamt-RNA von humanem RPE-Gewebe mittels RT-PCR isoliert. Das entstandene PCR-Produkt wurde mittels TA-Klonierung in den pCR®2.1-TOPO- Vektor kloniert. Danach wurde der BEST1-WT in den Expressionsvektor pCDNA3⁺ umkloniert. In den Wildtyp wurden mittels speziell designten Primern die Missense- und Deletionsmutationen eingefügt. Darauf folgte die Transfektion der Expressionsvektoren in MDCK II Zellen. Im Anschluss erfolgte die Generierung einer Zelllinie, die das mit einem Myc-Tag markierte *hBEST1* Wildtyp-Gen enthielt. Des Weiteren erfolgte die Charakterisierung eines N-terminalen Antikörpers gegen humanes Bestrophin, um mögliche C-terminale Interaktionen nicht zu stören oder gar zu unterbinden. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot und die intrazelluläre Lokalisation mittels immunhistochemischer Methoden dargestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Humane Gewebeproben

Für die Arbeiten wurden humane retinale Gewebeproben aus enukleierten Augen eingesetzt, die nach operativen Eingriffen anfielen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus Liebig Universität Gießen bewertet (Ethikantrag 258/13) und befürwortet.

2.1.2 Geräteindex

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Agarosegelelektrophorese	Compact S/M	Biometra, Göttingen
Elektroporator	Multiporator	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage		OHAUS, Nänikon (CH)
Geldokumentation	BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Inkubator (Bakterien)	BD 115	Binder, Tuttlingen
CO ₂ Brutschrank	BD 115	Binder, Tuttlingen
Inkubatorhaube	comfort 5355 R	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer	IKA RT classic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskop, Durchlicht	VWRI 630	VWR, Darmstadt
Epifluoreszenzmikroskop	Biozero	Keyence, Neu-Isenburg
Konfokales Laserscanermikroskop	Fluoview FV10i	Olympus, Hamburg
Orbitalschüttler	CERTOMAT MOII	Sartorius AG, Göttingen
PCR Thermocycler	T personal	Biometra, Göttingen
PCR Thermocycler (Gradient)	Tprofessional / Basic	Biometra, Göttingen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo, Giessen
Pipettierhilfen	Eppendorf Reference 1 - 10µl, 2 - 20µl, 10 - 100µl, 100 - 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg

Fortsetzung Tabelle 1: Geräte

Polyacrylamidelektrophorese	Multigel-long	Biometra, Göttingen
SDS-PAGE	Hoefler SE mini	Hoefler, Heidelberg
Mini Protean® Tetra System		BioRad, Dreieich
Transfersystem	Trans-Blot® Turbo™	BioRad, Dreieich
Taumelschüttler	Biometra WT17	Biometra, Göttingen
Thermoblock	TB2 Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortexer	Lab dancer	VWR, Darmstadt
Wasserbad	Julabo TW12	JULABO, Seelbach
Zentrifuge	4K 15	SIGMA, Osterode
Zentrifuge	1-15 PK	SIGMA, Osterode
Autoklav	DX65	SYSTEC, Wetttenberg
Eismaschine	AF18	Scotsman, Mailand (Italien)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Blotting Membran	Protran® Nitrocellulose Transfer Membran BA85	10401197	Whatman, Dassel
Blotting Papier	1,5 mm GB 005	10426994	Whatman, Dassel
Blotting Papier	0,34 mm 3mm Chr	3030917	Whatman, Dassel
			Serva, Heidelberg
Kryoröhrchen	CryoPure 2,0 ml	72.380	SARSTEDT, Nümbrecht
6-Loch-Platte	Cell Culture Plates with Inserts	PAA35006X	PAN BioTech, Aidenbach
Petrischalen 10 cm	Cellstar	664160	Sarstedt, Nümbrecht
24-Lochplatten	Brandplates®	782890	Brand, Wertheim
Inserts für 24 Lochplatten	Brandplates® Insert System	782810	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	1 - 10µl	720031	Biozym, Hess. Oldendorf
	1 - 10µl	701115	SARSTEDT, Nümbrecht
	100 - 1000µl	70.762	SARSTEDT, Nümbrecht

Fortsetzung Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

	2 - 200µl	4844	Corning, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	0,5 ml	72.699	SARSTEDT, Nümbrecht
	1,5 ml	72.690.001	SARSTEDT, Nümbrecht
	2,0 ml	72.691	SARSTEDT, Nümbrecht
	15 ml	188171	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	50 ml	227261	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röntgenfilm	Amersham Hyperfilm ECL	28-9068-40	GE Healthcare, Freiburg
Fettstift	PAP-PEN	S2002	Kisker, Steinfurt
Objektträger	SuperFrost	03-0060	Langenbrink, Emmendingen
Deckgläser	Automat Star	9.161.020	Schubert und Weiß, München
Quarzküvette	Suprasil	1052101085-40	Hellma Analytics, München
Einmal -Küvetten		759015	Brand, Wertheim
His-Tag-Säulen	Ni-NTA Spin Columns (50)	31014	Qiagen, Hilden

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Bestellnummer	Hersteller, Ort
30%ige Acrylamid- und Bisacrylamid-stammlösung (37,5:1)	C_3H_5NO	3029.2	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose GenAgarose LE	$C_{12}H_{18}O_9$	M3044.1000	Genaxxon, Ulm
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	$H_8N_2O_8S_2$	001201-0500	Merck, Darmstadt
Borsäure	HBO_3	6943.1	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	C_2H_6O + 1%MEK	K928.1	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, unvergällt	C_2H_6O	8006	J.T. Baker, München
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}N_3Br$	E 8751	SIGMA-ALDRICH, Steinheim
Glycin	$C_2H_5NO_2$	3908.2	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	HCl	1.00317.1000	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	1.06404.5000	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	6771.1	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	6781.1	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	1.04873	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	1.06346.0500	Merck, Darmstadt
Luria Broth (LB)		12795-027	Invitrogen, Darmstadt
Milchpulver, fettfrei			TSI, Zeven

Fortsetzung Tabelle 3: Chemikalien

Natriumdodecylsulfat (SDS) ultrapure	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	12795-027	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	2367.1	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	$(CH_2O)_n$	8.18715.010	Merck, Darmstadt
Select Agar		30391-023	Invitrogen, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	AE15.3	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X- 100	$C_{33}H_{60}O_{10}$	3051.3	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-114	$C_{30}H_{54}O_9$	A3848.0500	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	9127.1	Carl Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten		04693124001	Roche, Mannheim
Immersionsöl	IMMOIL- F30CC	86-834	Olympus, Hamburg
Ethylenediamine tetraacetic acid x 2 Na (EDTA)	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$ X 2 H_2O	8043.2	Carl Roth, Karlsruhe
BHT (Butylhydroxitoluol)	$C_{15}H_{24}O$	A3777	AppliChem, Darmstadt
Pronase		10165921001	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford Reagenz		39222.03	Serva,Heidelberg

2.1.5 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Enzym		Bestellnummer	Hersteller
<i>Ligasen</i>	T4 DNA Ligase	15224-025	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Restriktionsendo- nukleasen</i>	KpnI	ER0521	Fermentas, Sankt Leon-Rot
	XhoI	R0146S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
	BamHI	15201-031	Gibco, Eggenstein
<i>Polymerasen</i>	Prime Script Reverse Transcriptase	2680A	Takara, Saint-Germain-en- Laye (Frankreich)
	Taq- Polymerase	M3001.0250	Genaxxon, Ulm
	Phusion Hot Start DNA Polymerase	M0535S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Phosphatasen</i>	Antarktische Phosphatase	M0289S	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.6 Primer

Tabelle 5: Primer

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
Klonierungsprimer		
1851 V2-4RTa	CACTGCCTGGCCATGACCAT	72 °C
332 VMD211b	CCATTTGATTGAGGCTGTTG	72 °C
Mutageneseprimer		72 °C
1181 VMD- I295a	TCAACCCCTTTGGAGAGGATGA	72 °C
1182 VMD-I295b	GCTGCTCTGCCACCTTCAGC	72 °C
2449 ptVr-Hisc	P-caccatcactaa- GTTACTAGTGGATCCGAG	72 °C
2450 ptVr-Hisd	P-atggtgatggtggtg- GGAATGTGCTTCATCCCTGTTTTTC	72 °C
2059 V- N99Ka	P-GTACGAGAACTGCCGTGGCC	72 °C
2060 V-N99Kb	P-TGGTTCCACCAGCGGGTCAC	72 °C
2075 V-D312Na	P-TGGATTGTCAACAGGAATTTGCAGG	72 °C
2076 V-D312Nb	P-GTTGGTCTCAAATCATCATCATCC	72 °C
2437 ptVr-Mycb	P- cCtgATcAgcTTcTGcTCGGAATGTGCTTC ATCCCTGTTTTTC	72 °C
2438 ptVr-Myca	P-GAgGAgGAcCTg- TAAGTTACTAGTGATCCGAG	72 °C
2439 pTexV-taga	AGCTCGGATCCTCGAGTAAC	60 °C
2449 ptVr-Hisd	P-caccatcactaa- GTTACTAGTGGATCCGAG	65 °C
2450 ptVr-Hisd	P-atggtgatggtggtg- GGAATGTGCTTCATCCCTGTTTTTC	65 °C
2515 pTVex-tagf	AGAATgCGgCCgcCCAAC	60 °C
3170 Best-MyFLa	AGCACCCAGAAGTATCTCAA	72 °C
3171 Best-MyFLb	TCTGCTCGGAATGTGCTTCA	72 °C
3172 Best-HIFLa	ATGGAGCACCCAGAAGTA	72 °C
3173 Best- HIFLb	GTGATGGTGGTGGGAATG	72 °C

Die Primer, die ein (P-) vor der Sequenz tragen waren phosphoryliert

2.1.7 Vektoren und Plasmide

Tabelle 6: Vektoren und Plasmide

Vektoren/Plasmide	Bestellnummer	Hersteller, Ort
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	K4560-01	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1+	V790-20	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA [™] 5/FRT	V6010-20	Invitrogen, Karlsruhe
pOG44 Vector	V6005-20	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-N1		Zur Verfügung gestellt vom Institut de la Santé et de la recherche médicale (INSERM) der Universität Nantes (Frankreich)
pFRT/ <i>lacZeo</i>	K6010-02	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7.1 pCR[®]2.1-TOPO[®]-TA-Vektor

Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor setzt sich aus 3931 Basenpaaren zusammen (Abbildung 2-1). Er trägt das *lacZ* α -Gen, durch das die Insertion des DNA-Fragmentes in den Vektor geprüft werden kann. Das *lacZ* α -Gen kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase, mit der 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (XGal) in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo gespalten wird. Durch die Insertion eines DNA-Fragmentes in den Vektor wird das *lacZ* α -Gen geteilt, sodass die rekombinanten Klone keine β -Galaktosidase synthetisieren können und Klone mit Plasmiden mit Insert als weiße Kolonien erkennbar sind.

Des Weiteren enthält der Vektor eine M13 Vorwärts- und Reverse- Primerbindestelle sowie einen f1-Replikationsursprung, sodass einzelsträngige DNA zur Sequenzierung repliziert werden kann. Die Multiple-Klonierungsstelle enthält einen 3'-Thyminüberhang, der zur Insertion eines PCR-Fragments mit 3'-Adeninüberhang dient. Diese TA-Klonierungsstelle war der Nutzungsgrund für diesen Vektor. Darüber hinaus besitzt der Vektor einen T7-Promotor, der die Replikation des Inserts ermöglicht. Der pUC-Replikationsursprung dient als Startpunkt der Replikation des Plasmids. Zur Selektion der transfizierten Klone enthält der Vektor Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin.

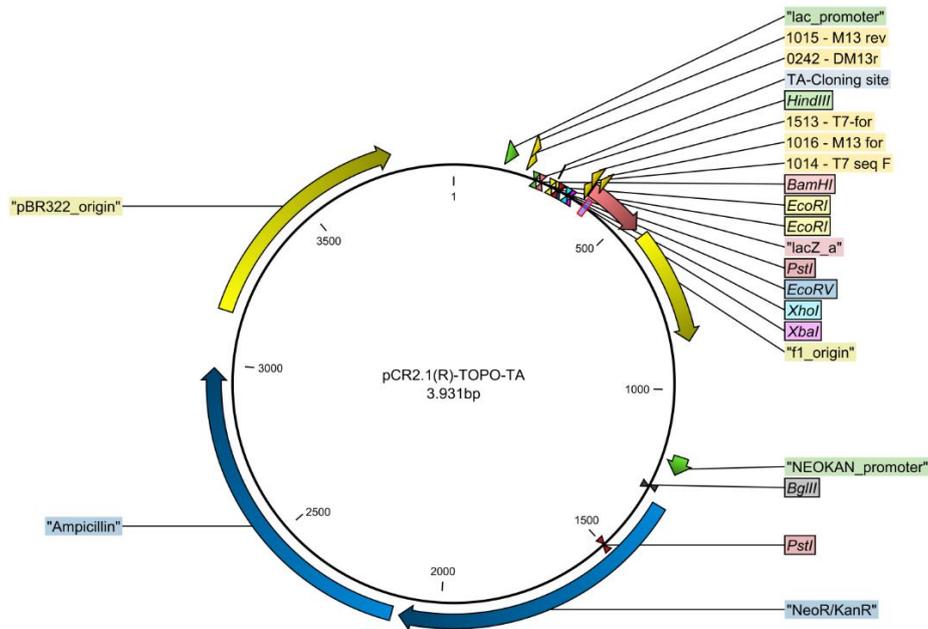


Abbildung 2-1: Vektorkarte des pCR2.1®-TOPO-TA-Vektors.

pBR322_origin und f1-origin: Replikationsstartpunkte; Ampicillin, NeoR/KanR: Antibiotikaresistenzgene. 1014-T7 seq F, 1513-T7 for und 1016-M13for: Sequenzierprimerbindestellen; TA-Cloning site: multiple Klonierungsstelle; HindIII, BamHI, EcoRI, PstI, EcoRV, XhoI, XbaI und BglIII: Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen; lacZ_a: lacZα-Gen, welches ein blau-weiß-Screening ermöglicht.

2.1.7.2 pcDNA3.1-Vektor

Der Expressionsvektor pcDNA3.1 besteht aus 5428 Basenpaaren (Abbildung 2-2A). Er besitzt einen schnellen Promotor aus dem humanen Zytomegalievirus (CMV), der für eine hohe und effiziente Expressionsrate des rekombinanten Proteins sorgt. Des Weiteren ermöglicht eine T7-Promotorstelle *in vitro* die Transkription in Strangrichtung und die Sequenzierung des Inserts. Die Multiple-Klonierungsstelle erlaubt die Insertion eines Gens mittels Restriktionsklonierung. Durch das Bovine-Growth-Hormon (BGH)-Poly-adenylierungssignal kann die Transkription effizient beendet und die mRNA polyadenyliert werden. Der f1-Replikationsursprung erlaubt die Replikation einzelsträngiger DNA. Der Vektor besitzt ein Resistenzgen gegen Neomycin, welches der Selektion der transfizierten Klone dient. Der SV40-Promotor und -Replikationsursprung sorgt für eine hohe Expressionsrate des Resistenzgens. Das SV40-Polyadenylierungssignal ist für die Beendigung der Transkription des Resistenzgens und die Polyadenylierung seiner mRNA zuständig. Am pUC-Replikationsursprung wird die Replikation in E.coli-Bakterienzellen geregelt. Der Vektor enthält weiterhin ein Resistenzgen gegen Ampicillin (bla), eine β-Laktamase und einen entsprechenden Promotor. Durch das Ampicillin-Resistenzgen können die in E.coli-Bakterienzellen transformierten Klone selektiert werden. Der Vektor kann in zwei Versionen

bezogen werden, in denen die Restriktionsendonukleaseschnittstellen der Multiplen-Klonierungsstelle in gegenläufiger Abfolge vorliegen (Abbildung 2-2B und C).

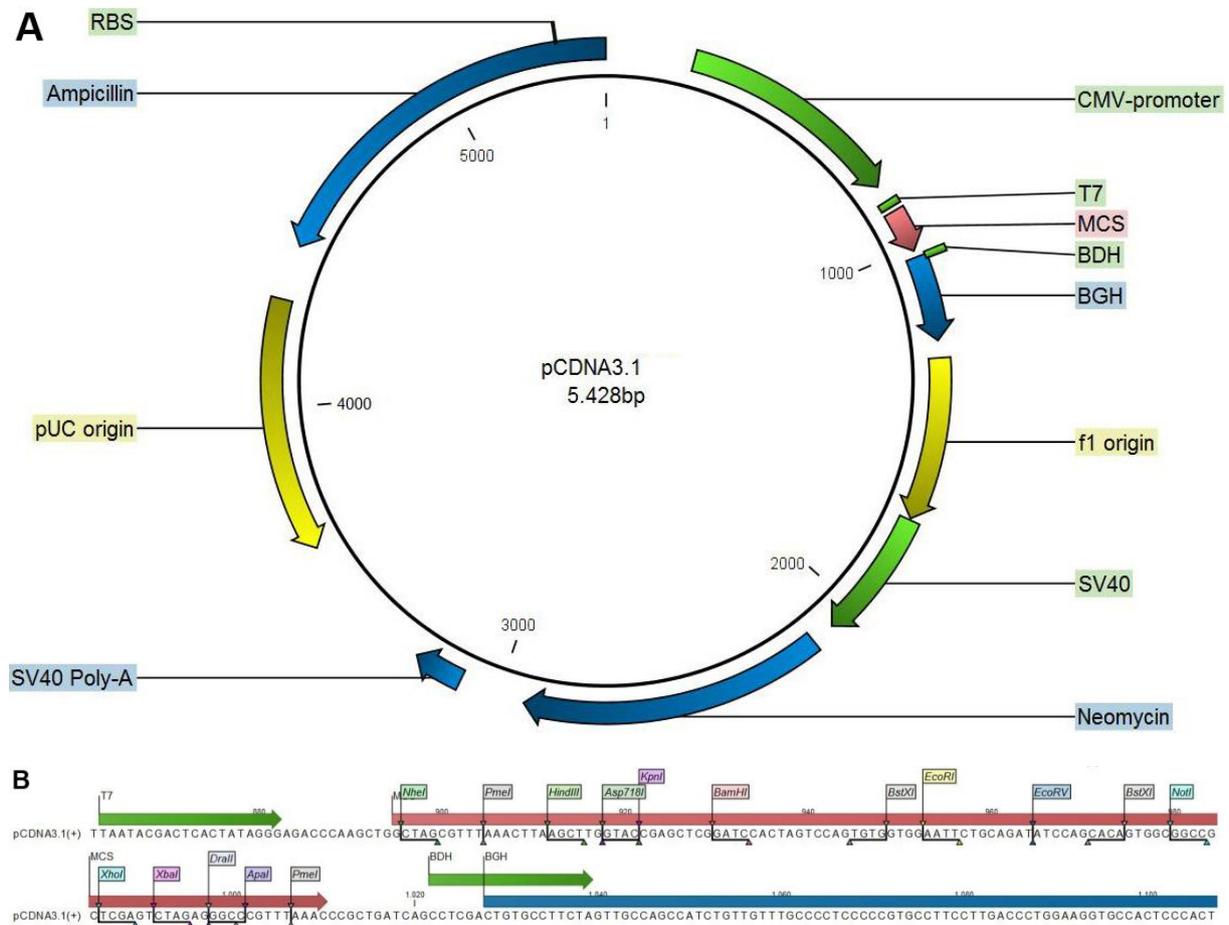


Abbildung 2-2: Vektorkarte des pCDNA3.1 Vektor.

A) zirkuläre Vektorkarte und Ausschnitt der multiplen Klonierungsstelle (MCS) B) für die (+)-Version.

pUC origin und f1 origin: Replikationsstartpunkte; BGH und SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignale; CMV und SV40: Promotoren; AMP und Neomycin: Antibiotikaresistenzgene; T7: Sequenzierprimerbindestelle; HindIII, BamHI, EcoRI, EcoRV, KpnI und XhoI: Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen

2.1.7.3 pcDNA™5/FRT-Vektor

Der Vektor pcDNA™5/FRT ist 5070 bp groß (Abbildung 2-3). Er besitzt einen schnellen Promotor aus dem humanen Zytomegalievirus (CMV), der für eine hohe und effiziente Expressionsrate des klonierten Gens sorgt. Die CMV-Bindestelle erlaubt die Sequenzierung in Strangrichtung. Des Weiteren ermöglicht eine T7-Promotorstelle *in vitro* die Transkription in Strangrichtung und die Sequenzierung des Inserts. Die Multiple-Klonierungsstelle erlaubt die Insertion des Gens mittels Restriktionsklonierung. Durch das Bovine-Growth-Hormon (BGH)-Polyadenylierungssignal kann die Transkription effizient beendet und die mRNA polyadenyliert werden. Der Vektor besitzt eine Flp Rekombination Target (FRT)-Stelle von 34 bp Länge, die als Binde- und Schnittstelle für die Flp-Rekombinase dient. Der Vektor besitzt ein Resistenzgen gegen Hygromycin B, zur Selektion stabil transfizierter Klone in humanen Zelllinien. Dazu muss das Gen mit einem Startkodon (ATG) und einem Promotor mittels Flp-Rekombinase vermittelter Rekombination zusammengebracht werden. Das SV40-Polyadenylierungssignal ist für die Beendigung der Transkription des Resistenzgens und die Polyadenylierung seiner mRNA zuständig. Am pUC-Replikationsursprung wird die Replikation in E.coli-Bakterienzellen geregelt. Der Vektor enthält weiterhin ein Resistenzgen gegen Ampicillin, eine β -Laktamase und den entsprechenden Promotor. Durch das Ampicillin-Resistenzgen können die in E.coli-Bakterienzellen transformierten Klone selektiert werden.

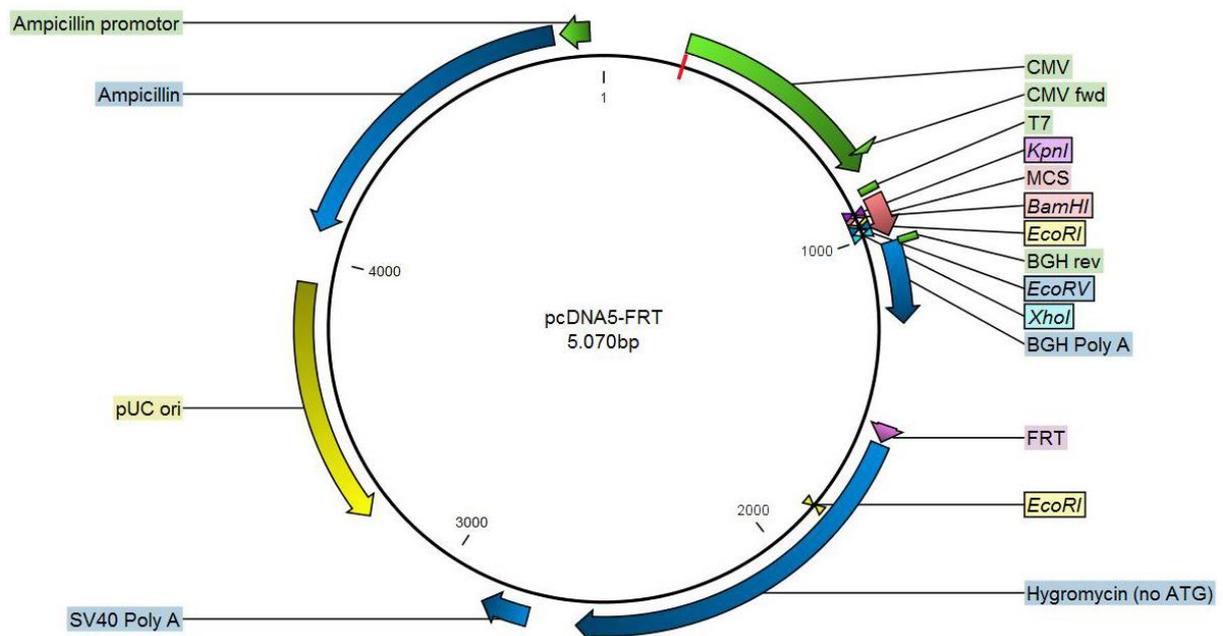


Abbildung 2-3: Vektorkarte des pcDNA5-FRT-Vektors.

pUC ori: Replikationsstartstelle; Ampicillin und Hygromycin (no ATG): Antibiotikaresistenzgene; BGH Poly A und SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignale; FRT site: FLP Rekombination Target für die Integration des Vektors in das Genom der Flip-In host Zelllinie; CMV fwd und bla promotor: Promotoren.

2.1.7.4 pOG44-Plasmid

Dieses Plasmid verfügt über einen offenen Leserahmen für FLP. Dieser codiert für eine temperatursensitive Flp-Rekombinase, die die Rekombination mittels der FRT-Stelle vermittelt. Der schnelle Promotor aus dem humanen Cytomegalievirus (CMV) sorgt für eine hohe Expressionsrate des FLP-Gens und über ein synthetisches Intron für eine verstärkte Expression des FLP-Gens (Abbildung 2-4). Dieses Hybridfragment beinhaltet Sequenzen, die aus dem Adenovirus stammen und eine IgG variable Region. Das SV40-Polyadenylierungssignal ist für die Beendigung der Transkription und die Polyadenylierung der mRNA zuständig. Am pUC-Replikationsursprung wird die Replikation in E.coli-Bakterienzellen geregelt. Der Vektor enthält weiterhin ein Resistenzgen gegen Ampicillin, eine β -Laktamase und einen entsprechenden Promotor. Durch das Ampicillin-Resistenzgen können die in E.coli-Bakterienzellen transformierten Klone selektiert werden.

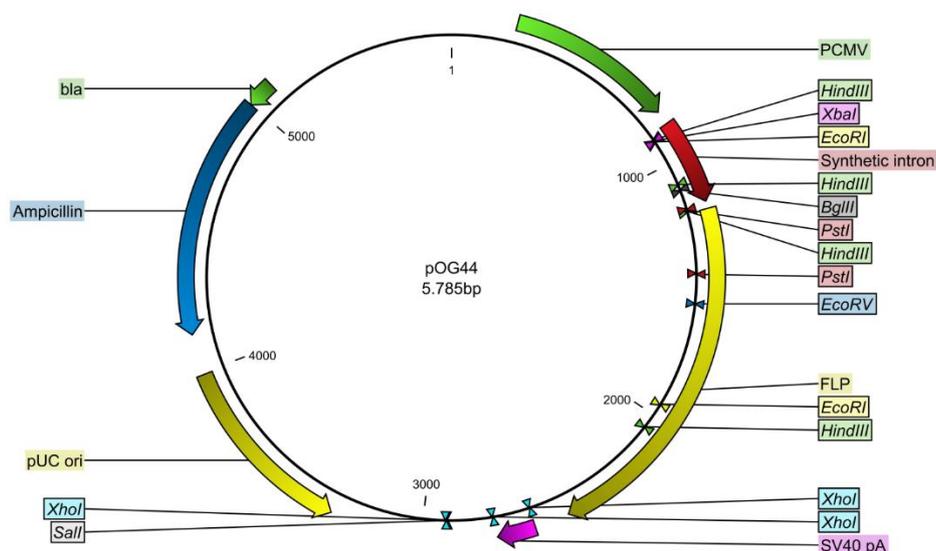


Abbildung 2-4: Vektorkarte des pOG44- Plasmids.

PCMV : CMV-Promotor; FLP: Rekombinase; SV40 pA: Polyadenylierungssignal; pUC ori: Replikationsstartpunkt; bla: Promotor für das Antibiotikumresistenzgen, Ampicillin: Antibiotikumresistenzgen.

2.1.7.5 pEGFP-N1-Vektor

Die Qualle *Aequorea sp.* verfügt über Zellen, die grünes Licht emittieren. Diese Zellen beinhalten Aequorin und das grün fluoreszierende Protein (GFP). GFP ist stark fluoreszierend und wird mittels Energietransfer des Calcium-aktivierten Photoproteins Aequorin aktiviert. Die GFP-cDNA wird von eukaryotischen wie prokaryotischen Zellen exprimiert und es wird ein grün fluoreszierendes Produkt gebildet. Dazu werden keine exogenen Kofaktoren oder Substanzen benötigt, sodass die Expression von GFP als Kontrolle für

Transfektionsexperimente herangezogen werden kann. EGFP-N1 stellt eine Variante des Wildtyp-GFP dar, die eine höhere Expressionsrate in Säugerzellen und eine verstärkte Fluoreszenz bei Anregung mit 488 nm Wellenlänge zeigt.

Der Vektor besteht aus 4.733 bp und trägt eine multiple Klonierungsstelle, die sich zwischen dem CMV immediate early-Promotor und der kodierenden Sequenz befindet (Abbildung 2-5). Das SV40-Polyadenylierungssignal, welches sich stromabwärts der kodierenden Sequenz befindet, regelt die korrekte Prozessierung des 3'-Endes der mRNA des *eGFP*. Weiterhin enthält der Vektor einen SV40-Replikationsursprung. Der Selektion dient eine Neomycinresistenz-Kassette, die aus dem SV40-early-Promotor, dem Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen und dem HSV TK-Polyadenylierungssignal besteht. Zur Vermehrung in *E. coli* gibt es einen pUC-Replikationsursprung und einen f1-Ursprung zur Produktion einzelsträngiger DNA.

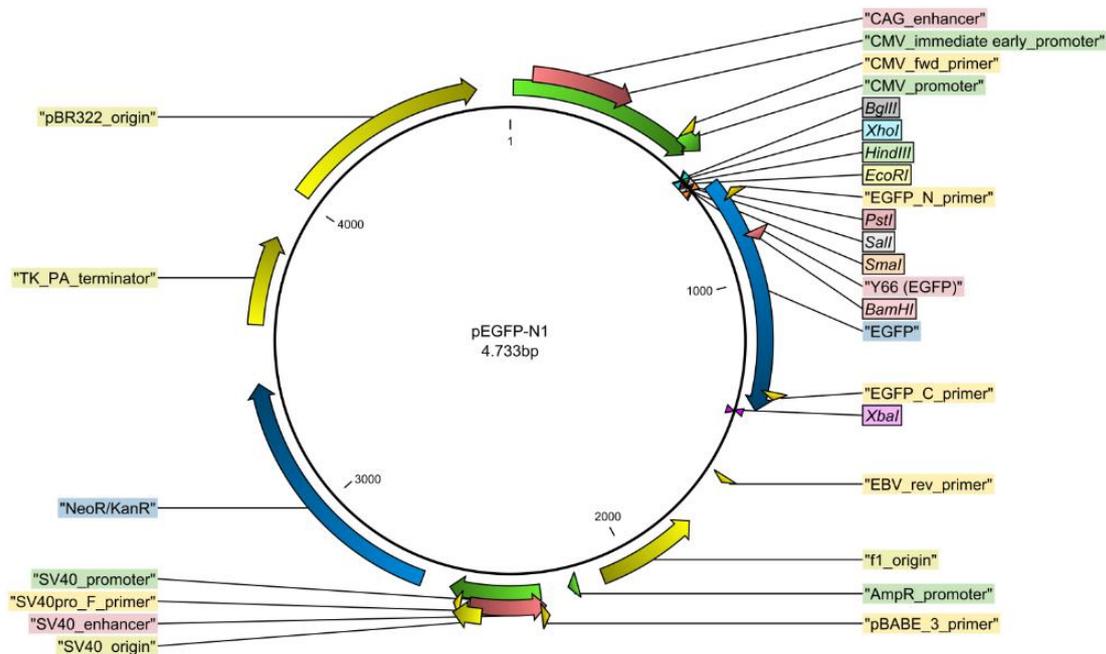


Abbildung 2-5: Vektorkarte des pEGFP-N1-Vektors.

pBR322_origin, f1_origin und SV40_origin: Replikationsstartpunkte; EGFP: Green Fluorescent Protein Gen; NeoR/KanR: Antibiotikaresistenzgene; SV40_promotor, AmpR_promotor und CMV_promotor: Promotoren; CMV_fwd_primer, EGFP_N_primer EGFP_C_primer, EBV_rev_primer, pBABE_3_primer und SV40pro_F_primer: Sequenzierprimer; BglIII, XhoI, EcoRI, PstI, Sall, SmaI, BamHI und XbaI: Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen.

2.1.7.6 pFRT/lacZeo-Vektor

Der Vektor besteht aus 8106 bp und verfügt über eine Flp Recombination Target site (FRT), die eine 34 bp lange Sequenz darstellt, die als Binde- und Spaltstelle für die Flp-Rekombinase dient. Der Vektor verfügt des Weiteren über das lacZ-Zeoizin- Fusionsgen, das ein Fusionsprotein codiert, welches aus der β -Galaktosidase und dem Zeozin-Resistenzmarker besteht. Dies ermöglicht die Selektion von Säugerzelllinien mit Zeozin, die über einen β -Galaktosidase- Assay identifiziert werden können. Der Vektor besitzt einen schnellen SV40-Promotor (Abbildung 2-6). Dieser sorgt für eine effiziente, hohe Expression des lacZ-Zeoizin-Fusionsgens in Mammaliazelllinien und episomale Replikation in Zellen, die das große SV40 T-Antigen exprimieren. Der Vektor verfügt über ein ATG-Startcodon, welches die Translation des lacZ-Zeoizin-Fusionsproteins ermöglicht und ein schnelles SV40-Polyadenylierungssignal, welches eine effiziente Termination der Transkription und die Polyadenylierung der mRNA gewährleistet. Der bla Promotor, der sich vor dem Ampicillinresistenzgen befindet, ermöglicht die Expression des Ampicillinresistenzgens (bla) und so die Selektion von transformierten E. coli. Der pUC Replikationsursprung bewirkt eine hohe Replikation in E. coli.

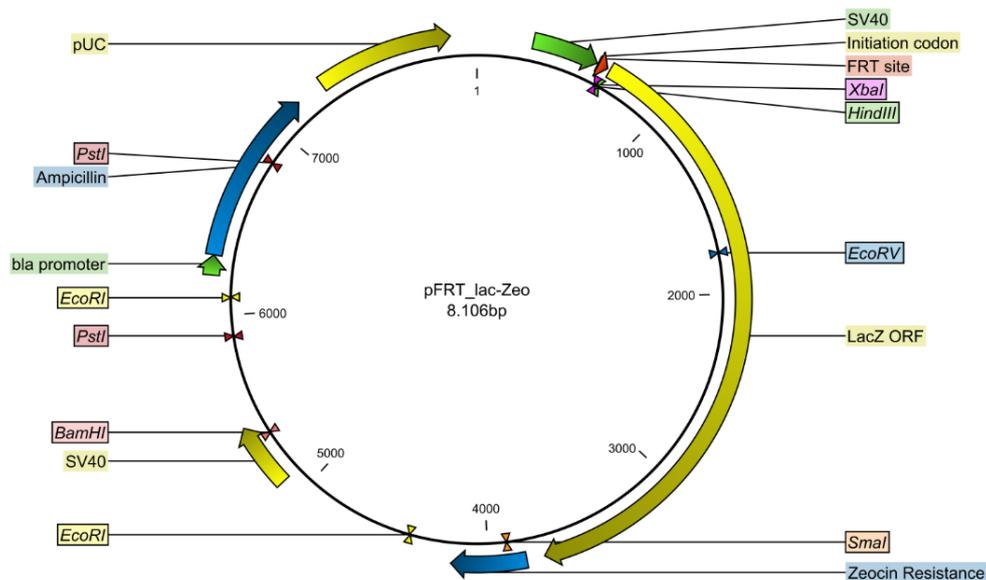


Abbildung 2-6 : Vektorkarte des pFRT_lac-Zeo-Vektors.

pUC: Replikationsstartstelle; Ampicillin und Zeocin Resistance: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin und Zeocin); FRT site: FLP Recombination Target für die Integration des Vektors in das Genom der Flip-In host Zelllinie; bla promotor und SV40: Promotoren; LacZ ORF: offener Leserahmen des LacZ-Gens; XbaI, HindIII, EcoRV, Smal, EcoRI, BamHI und PstI: Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen.

2.1.8 Größenmarker

Tabelle 7: Größenmarker

	Größenmarker	Hersteller, Ort
Proteingrößenmarker	Spektra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
DNA-Größenmarker	GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
	GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9 Antikörper zur Charakterisierung von Proteinen

Tabelle 8: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und DNA-Farbstoffe

	Antikörper (Wirt)	Bestellnummer	Terminus	Hersteller, Ort
Primär-antikörper	Anti BEST 1 (BEST1-N204-220, Huhn)		N	Davids Biotechnologie, Regensburg
	Anti BEST1 (C-14, Ziege)	Sc-22027	C	Santa Cruz, Heidelberg
	Anti BEST1 (E6-6, Maus)	Ab2182	C	Abcam, Cambridge (UK)
	Anti E-Cadherin (Kaninchen)	3195	C	Cell Signaling, Darmstadt
	Anti 6X His tag	Ab1187		Abcam, Cambridge (UK)
	Anti 6-His FITC konjugiert (Ziege)	18812F		QED Bioscience Inc., San Diego (Kalifornien)
	Anti Myc-Tag (Kaninchen)	2272		Cell Signaling, Darmstadt
	Anti Myc-Tag HRP konjugiert	AB1261		Abcam, Cambridge (UK)
Sekundär-antikörper	Huhn IgG (IgY) HRP konjugiert	A30-101P		Bethyl, Montgomery (Texas, USA)
	Anti Huhn IgY Dylight350	ABIN 1110358		Agrisera, Vännas (Schweden)
Alexa Fluor 350	Anti Maus IgG	A21081		Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488	Anti Maus IgG	A21202		Invitrogen, Karlsruhe
	Anti Kaninchen IgG	A21206		Invitrogen, Karlsruhe

Fortsetzung Tabelle 8: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und DNA-Farbstoffe

Alexa Fluor 488	Anti Huhn IgG	A11039		Invitrogen, Karlsruhe
	Anti Ziege IgG	A11078		Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 594	Anti Kaninchen IgG	A21207		Invitrogen, Karlsruhe
	Anti Huhn IgG	A11042		Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 546	Anti Maus IgG	A10036		Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Farbstoffe	DAPI	D1306		Invitrogen, Karlsruhe
	TOPRO3	T3605		Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10 Lösungen und Puffer

Tabelle 9: Lösungen und Puffer

10 x PBS (phosphate buffered saline)

137 mM NaCl (80 g)
 2,7 mM KCl (2 g)
 10 mM Na₂HPO₄ (14,4 g)
 1,47 mM KH₂PO₄ (2,4 g)
 mit 800 ml Aqua dest. auffüllen
 mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen
 auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen und Sterilfiltrieren
 100 ml 10 x PBS mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen

1 x PBS

4% Formaldehyd- PBS- Lösung

4 g PFA in
 80 ml 1 x PBS
 mit HCl konz. auf pH 7,4 einstellen
 mit 1 x PBS auf 100 ml auffüllen

Blocklösung mit 3% BSA

0,3 g BSA
 100 µl Triton X100 auf 10 ml mit 1 x PBS auffüllen

Fortsetzung Tabelle 9 Lösungen und Puffer

10 x TBS (Tris buffered saline)	1,5 M NaCl (87,6 g) 500 mM Tris Base (60,6 g) in 800 ml Aqua dest. lösen mit HCl konz. auf pH 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
1 x TBS	100 ml 10 x TBS mit 900 ml Aqua dest. auf 1 l auffüllen
1 x TBS-T	100 ml 10 x TBS mit 900 ml Aqua dest. und 500 µl Triton X100 auffüllen
10 X Western Transferpuffer	250 mM Tris Base (30,3 g) 2 M Glycin (144,1 g) mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
1 X Western Transferpuffer	100 ml 10 X Western Transferpuffer mit 900 ml Aqua dest. auf 1 l auffüllen
10 X SDS-Laufpuffer	250 mM Tris Base (30 g) 2 M Glycin (144 g) 35 mM SDS (10 g) mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
1 x SDS-Laufpuffer	100 ml 10 X SDS-Laufpuffer mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen
Probenpuffer nach Laemmli (5x)	225 mM Tris (1,36 g) pH 6,8 5 % (w/v) SDS (2,5 g) 50 % (v/v) Glycerin (25 ml) 0,25 M DTT (1,9 g) 0,05 % (v/v) Bromphenolblau 2,5 ml (aus 1%iger Lösung) Ad 50 ml Aqua dest.

Fortsetzung Tabelle 9 Lösungen und Puffer

Lysispuffer nach Bordier	10 mM Tris Base (1,2 g) 150 mM NaCl (8,8 g) mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
10 x TBE-Puffer	1 mM Tris (0,12 g) 1 M Borsäure (61,83 g) 20 mM EDTA (5,8 g) mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
1 X TBE-Puffer	100 ml 10 X TBE-Puffer mit 900 ml Aqua dest. auffüllen
Blockierlösung	5 g Magermilchpulver mit 1 xTBS auf 50 ml auffüllen
0,15 M KCl	11,2 g KCl mit Aqua dest auf 1 l auffüllen
SE-Puffer	10 mM Tris (1,2 g) 10 mM EDTA (2,9 g) 150 mM NaCl (8,8 g) mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen mit HCl auf pH 8,0 einstellen mit Aqua dest auf 1 l auffüllen
6 M NaCl	350,6 g NaCl mit Aqua dest auf 1 l auffüllen
TE-Puffer	10 mM Tris (1,2 g) 1 mM EDTA (0,372 g) mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen mit HCl auf pH 8,0 einstellen mit Aqua dest auf 1 l auffüllen
70 % Ethanol	700 ml Ethanol abs. mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

2.1.11 Kits und Reagenziensysteme

Tabelle 10: Kits und Reagenziensysteme

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Accutase	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Coomassie Plus (Bradford) Assay-Kit	Thermo Scientific, Schwerte
TransBlot®Turbo™ Transfer Pack	BioRad, Dreieich
ECL Western blotting detection reagents (1)	GE Healthcare, Amersham, München
ECL Western blotting detection reagents (2)	GE Healthcare, Amersham, München
SERVALight Polaris Western Blot detection kit	SERVA, Heidelberg
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Baltimore (USA)
Miniprep Plasmid DNA Purification	Macherey-Nagel, Düren
Säulen zur DNA-Aufreinigung	Genaxxon, Ulm
Ni-NTA Säule	Qiagen, Hilden
NucleoSpin Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Maxiprep-Kit	Qiagen, Hilden
K2®Transfection System	Biontex, Planegg (München)
TOPO TA Cloning-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
PureLink RNA Mini Kit	Life Technologies, Darmstadt

2.1.12 Eukaryotische Zelllinien und Bakterien

2.1.12.1 Medien für eukaryotische Zelllinien

Tabelle 11: Medium für die Zellkultur

Medium	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Tabelle 12: Mediumzusätze für die Zellkultur

Zusatz	Hersteller
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
L- Glutamin	Biochrom, Berlin
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Hygromycin B zur Selektion	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 13: Vollmedium zur Kultivierung von adhärenenten Zelllinien

DMEM⁺⁺⁺	100 × Penicillin/Streptomycin (enthält 10.000 U/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycin)	5 ml
	4 mM L-Glutamin	10 ml
	10 % FKS	50 ml
	ad 435 ml DMEM High Glucose	

2.1.12.2 Bakterienkultur

Tabelle 14: Medium und Nährboden für die Bakterienkultur

LB Medium	Luria Broth (LB)	12,5 g / 500 ml Aqua dest.
Für Agarplatten:	1,5% Select Agar	7,5 g hinzufügen, autoklavieren und bei 42 °C verarbeiten; fertige Platten bei 4 °C lagern
Zur Selektion:	100 µg/ml Ampicillin	1 µl/ml Medium
	10 µg/µl Tetracyclin	1 µl/ml Medium

Tabelle 15 : Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genetische Eigenschaften	Hersteller, Ort
XL1-Blue E.coli	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn 10</i> (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg
One Shot TOP10 Competent Cells	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galJ galK rpsL</i> (St ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Darmstadt

2.1.12.3 Zelllinien

Tabelle 16: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Hersteller, Ort
MDCK II ATCC® CCL-34	LGC Standards GmbH, Wesel
HEK293T/17 ATCC® CRL-11268	LGC Standards GmbH, Wesel

2.1.12.3.1 MDCK-II- Zelllinie

Die MDCK Zelllinie entstammt der Niere einer gesunden, erwachsenen Cockerspanielhündin. Die Zelllinie wurde im September 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby hergestellt. Bei MDCK-II-Zellen handelt es sich um einen von insgesamt sechs Subklonen der heterogenen Elternzelllinie. Die Zelllinie ist für die Transfektion geeignet. Des Weiteren wird sie für Studien zur Entstehung und Unterhaltung der Oberflächenpolarität von Epithelzellen genutzt (Balcarova-Ständer et al., 1984).

2.1.12.3.2 HEK293T/17-Zelllinie

Diese humanen embryonalen Nierenzellen wurden von Graham et al. mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 transformiert. Die transformierten HEK293T/17-Zellen zeigten die typischen Eigenschaften Adenovirus-transformierter Zellen mit Bildung von Zellhaufen und Teilungstendenz der Zellen bei Konfluenz. Die Zellen besaßen epithelialen Charakter und eine große Variationsbreite bezüglich der Zellgröße. Durch die Immortalisierung dieser Zellkultur konnte eine humane Zelllinie hergestellt werden. Eingebroughte Plasmid-Vektoren mit einem CMV-Promotor nutzen effektiv den Proteinsyntheseapparat der Zelllinie und erzwingen die Translation der Gene, die künstlich in einen Plasmid-Vektor inkloniert worden sind (Graham FL et al., 1977). Der Klon 17 wurde gewählt, weil er sehr gut und einfach zu transfizieren ist.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufreinigung von Biomolekülen

2.2.1.1 Isolation von DNA aus Zellkulturen

Es wurde 1 ml Zellsuspension in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz bei Sichtkontrolle kultiviert. Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde das Nährmedium abgezogen und verworfen, die Zellen mit sterilem 1 X PBS gewaschen und mit 2 ml Accutase überschichtet. Die Platten wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis alle Zellen sich von der Platte gelöst hatten. Die Accutase-reaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml Nährmedium (DMEM⁺⁺⁺) gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei Raumtemperatur mit 300 g für 5 Min abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2 Mal mit je 10 ml 0,15 M KCl gewaschen und jeweils mit 1150 rpm bei 4 °C für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen.

Danach wurde das Pellet mit 1250 µl SE-Puffer, 6,25 µl Pronase und 62,5 µl 20 % SDS überschichtet, gut gemischt und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß daran wurden 350 µl 6 M NaCl zu der Probe gegeben und der Ansatz für 15 s auf dem Vortexer gemischt. Danach wurde die Probe für 20 Min bei 20 °C und mit 5100 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Röhrchen überführt, mit Ethanol abs. auf 10 ml aufgefüllt und erneut für 30 Min mit 5100 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol überschichtet und ohne Mischen bei 4 °C für 5 Min bei 1180 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet über Kopf bei RT getrocknet.

Danach wurde das Pellet in 350 µl TE-Puffer gelöst und die DNA-Konzentration optisch mittels eines Eppendorf BioPhotometers bestimmt.

2.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

2.2.1.2.1 Plasmid-Minipräparation

Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen wurde über eine Plasmid-Minipräparation mit Puffern der Firma Machery-Nagel isoliert.

2 ml einer Bakterienübernachtkultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 2 Min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl S1-Puffer (Resuspendierungspuffer) wurden zu dem Bakterienpellet gegeben. Dieses wurde vollständig in dem Puffer gelöst. Danach wurden 100 µl S2-Puffer (Lysis-puffer) zu dem Gemisch pipettiert,

um die Bakterienzellen aufzubrechen. Das Gefäß wurde einige Male invertiert. Im Anschluß wurden 100 µl S3-Puffer (Neutralisierungspuffer) in das Gefäß gegeben und selbiges erneut mehrere Male invertiert, um die Lyse zu beenden. Dann wurde das Gefäß für 10 Min bei 17.968 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 700 µl eiskaltes absolutes Ethanol zugesetzt, um die DNA zu fällen. Danach wurde der Ansatz für 30 Min bei 17.968 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 200 µl 70% Ethanol zugegeben, um die DNA zu entsalzen. Es wurde erneut für 10 Min bei 17.968 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 30 µl Aqua bidest. resuspendiert.

2.2.1.2.2 Plasmid-Maxipräparation

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt wie die in 2.2.1.2.1 beschriebene Minipräparation über alkalische Lyse aus einer 100 ml Bakterienübernachtskultur. Es wurde das Maxi Prep-Kit von Qiagen verwendet.

Die Bakterienübernachtskultur wurde zunächst abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Suspensionpuffer aufgenommen und mit Lysispuffer versetzt. Die DNA wurde so in einem stark alkalischen Milieu denaturiert und nach erfolgter Neutralisierung hybridisierten die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder. Danach wurde die Plasmid-DNA an eine Säule mit Anionenaustauscherharz gebunden, Verunreinigungen entfernt und danach eluiert und mit Isopropanol ausgefällt. Die aus der Maxi-Prep gewonnene DNA eignet sich sehr gut für Transfektionsexperimente. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

2.2.1.3.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen durch Zentrifugation

Nach der Gelelektrophorese (2.2.12.3) wurde die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht und die entsprechenden Banden mit einer Stanze aus dem Gel ausgestochen. Die Gelstücke wurden auf eine Genaxxon-Säule gelegt und bei 8.000 g für 10 Min zentrifugiert und so die DNA mit dem Eluat aus der Agarose gespült.

2.2.1.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit dem NucleoSpin Extract Kit

Nach der Gelelektrophorese (2.2.12.3) wurde die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht und die entsprechenden Banden mit einer Stanze aus dem Gel ausgestochen. Die Agaroseblöcke wurden in ein 1,5 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß gegeben und gewogen. Pro 100 mg Agarosegel wurden 200 µl Puffer NT1 dazugegeben und der Ansatz für 10 Min bei 50 °C inkubiert. Während dessen wurde mehrfach resuspendiert bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Im Anschluss wurde die DNA unter Vorhandensein von chaotropen Salzen an die Silikatmembran der NucleoSpin Extract-Säule gebunden. Die Säule wurde dafür in einem Sammelgefäß platziert und mit der Probe beladen. Die Säule wurde für eine Minute bei 11.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder in dem Sammelgefäß platziert. Danach wurden in einem Waschschrift mit 700 µl des ethanolhaltigen Puffers NT3 Kontaminationen entfernt. Die Säule wurde für eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde wieder in dem Sammelgefäß platziert und für weitere zwei Minuten bei 11.000 g zentrifugiert, um Rückstände des NT3 Puffers vollständig zu entfernen. Die Säule wurde anschließend bei 70 °C für 5 Min inkubiert und in einem neuen 1,5 ml Gefäß platziert. Schließlich wurde die DNA mit 30 µl des salzarmen Puffers NE eluiert. Der Ansatz wurde für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss noch einmal für eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Im Anschluss lag die Plasmid-DNA hochrein für die weitere Verwendung vor.

2.2.1.4 Extraktion von Proteinen

Um die Proteine aus den transient transfizierten Zellen zu isolieren, wurde ein modifiziertes Protokoll von Bordier (Bordier, 1981) verwendet. Dazu musste zunächst das Detergenz Triton X-114 vorkondensiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung bestehend aus 980 ml 1 X TBS, 16 mg Butylhydroxytoluol (BHT) und 20 g Triton X-114 unter Rühren hergestellt. Die Lösung wurde im Anschluss in einen zuvor für 45 Min auf Eis gekühlten Scheidetrichter überführt und üN bei 30 °C inkubiert. Die wässrige Oberphase wurde am nächsten Tag verworfen und durch die gleiche Menge an eiskaltem 1 X TBS unter Rühren ersetzt. Dieses Vorgehen wurde noch einmal wiederholt bevor die Triton X-114 haltige Fraktion abgelassen wurde und bei 4 °C für weitere Experimente gelagert wurde.

Zur Isolation der Proteine aus den Zellen wurde eine Mischung aus Lysispuffer und 1% Triton X-114 gegeben und der Ansatz bei 4 °C für 1 h unter Schwenken inkubiert. Das nichtionische Detergenz Triton X-114 hat unter gekühlten Bedingungen optimale Solubilisierungseigenschaften. Detergenzmicellen bilden mit dem umgebenden Wasser Wasserstoffbrücken und bleiben daher in Lösung. Danach wurden die Zellen mit einem

Zellschaber von der Platte gelöst und die gesamte Suspension in ein 1,5 ml bzw. 2 ml Schnappdeckelgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C und 13000 g für 20 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Schnappdeckelgefäß überführt und das Zellpellet in 5 x Lämmli-puffer resuspendiert. Beides wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Geweben

Die Gewebeprobe wurde mit 0,6 ml Lysis-puffer in ein eisgekühltes 2 ml Schraubdeckelgefäß mit Porzellankügelchen gegeben. Die Probe wurde zweimal für jeweils 30 s homogenisiert und im Anschluss mit 2600 g bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in ein RNase freies 1,5 ml Schnappdeckelgefäß überführt. Es wurde ein Volumen 70% EtOH zugesetzt und die Probe gevortext. 700 µl der Probe wurden auf eine Säule gegeben und mit 12.000 g für 15 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die gesamte Probe verarbeitet war. Im Anschluss wurden 700 µl Waschpuffer zugesetzt und die Probe mit 12.000 g für 15 s zentrifugiert. Der Überstand und das Sammelgefäß wurden verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt. Im Anschluss wurde die Probe mit 500 µl Waschpuffer II überschichtet und mit 12.000 g für 15 s bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die letzten beiden Schritte wurden nochmals wiederholt. Im Anschluss wurde die Probe zwecks Trocknung für 1 Min bei 12.000 g bei RT zentrifugiert und das Sammelgefäß verworfen. Danach wurden 50 µl RNase freies Wasser in die Mitte der Säule pipettiert und die Probe für 1 Min bei RT inkubiert. Danach wurde die Probe für weitere 2 Min mit 12.000 g bei RT zentrifugiert. Für die kurzzeitige Lagerung wurde die RNA bei -20°C und für die langfristige Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial für die reverse Transkription diente die Gesamt-RNA des *hBEST1*, die aus humanem RPE-Gewebe eines enukleierten humanen Auges (Präparation 1925.01) gewonnen wurde. Mittels der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus stammt und eines sequenzspezifischen Primers wurde die cDNA des entsprechenden RNA-Abschnitts hergestellt.

Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkription setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl	10 pmol/µl Gen-spezifischer Primer
2 µl	Gesamt-RNA (ca. 250 ng)
1 µl	dNTP-Mischung (10 mM)
<u>6 µl</u>	<u>RNase freies Wasser</u>
<u>10 µl</u>	

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und 5 Min im Heizblock bei 95 °C erhitzt, um das RNA-Primer-Gemisch zu denaturieren. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden dem RNA-Primer-Gemisch noch folgende Chemikalien zugesetzt:

4 µl	5xPrime Script Puffer
10 µl	200 U/µl Prime Script Reverse Transkriptase
0,5 µl	RNase Inhibitor
<u>5,5 µl</u>	<u>RNase freies Wasser</u>
20 µl	

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für 60 Min auf 50 °C erwärmt. Zwecks Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde der Reaktionsansatz für 5 Min auf 95 °C erhitzt und direkt im Anschluss auf Eis gekühlt.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Standardverfahren für die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Vor Beginn der Amplifikation steht ein initialer Denaturierungsschritt, der abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase zwischen 94 °C und 98 °C für 30 s bis zu 5 Min durchgeführt wurde. Dabei wurden die beiden Stränge der Ausgangs-DNA (Template) zur Anbindung der Oligonukleotidprimer und anschließenden Synthese des doppelsträngigen Produktes getrennt. Der sich anschließende Reaktionszyklus gliederte sich in drei Einzelschritte:

Denaturierung: Die Reaktionslösung mit der Template-DNA, der jeweilig eingesetzten Polymerase, den Primern und den Nukleotiden wurde abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase (Tabelle 4) zwischen 94 °C und 98 °C für 10 s bis zu 1 Min erhitzt. Dadurch trennten sich die beiden komplementären Stränge, die DNA denaturierte.

Hybridisierung (Annealing): Durch das Herabsetzen der Temperatur auf zwischen 50 °C und 65° (spezifisch für jedes Primerpaar, siehe Tabelle 5) lagerten sich die Primer an die

denaturierte einzelsträngige DNA an. Diese Wasserstoffbrückenbindung war nur dann stabil, wenn Templatessequenz und Primersequenz komplementär waren.

Tabelle 17: Polymerasespezifische Reaktionsbedingungen

Polymerase	Denaturierung Temperatur [°C] / Zeit [s]	Elongation Temperatur [°C] / Zeit [s]	Zyklen
Taq- Polymerase	94°C / 15 s	72 °C / 60 s	40
Phusion Hot Start DNA Polymerase	95°C / 15 s	72°C / 60 s	35

Elongation: Von den Primern aus verlängerten die Polymerasen das DNA-Molekül durch weitere Nucleotide komplementär zur Templatessequenz. Für diese Verlängerung der neuen DNA-Moleküle wurde die Temperatur auf 72 °C erhöht. Dies war die optimale Arbeitstemperatur der Polymerasen. Die Erhöhung der Temperatur hatte zudem den Vorteil, dass die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Primer und Template mit unvollständiger Komplementarität getrennt und die Bindungen spezifischer wurden.

Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelte sich bei optimaler Reaktion die Zahl der DNA-Moleküle in jedem Zyklus. Die Methode führte also zu einer exponentiellen Amplifikation.

Die PCR wurde in dieser Arbeit für folgende Aufgaben angewendet:

Die Takara-Polymerase wurde für die Long Range-PCR zur Amplifikation des *hBEST1*-Transkriptes eingesetzt, da sie eine sehr effiziente Exonuclease-Aktivität besitzt und so Lesefehler vermieden werden. Es entstehen stumpfe Enden.

Die Phusion-Polymerase wurde für die Long Range-PCRs zur Umklonierung des *hBEST1* – His-Inserts in die Expressionsvektoren und für die Mutagenese PCRs der *hBEST1*-Vektoren eingesetzt. Auch diese Polymerase generiert stumpfe Enden.

2.2.4.1 Long Range–PCR zur Amplifikation großer DNA-Fragmente

Um aus der cDNA ein definiertes DNA-Fragment zu extrahieren, wurde eine LongRange-PCR zur Amplifikation großer DNA-Fragmente durchgeführt. Das Prinzip der PCR-Reaktion wurde bereits in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Es kam die Takara-Polymerase zum Einsatz, da sie eine äußerst effiziente Exonuclease-Aktivität besitzt und auf diese Weise Lesefehler vermieden werden.

Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

1,0 µl	10 pmol/ µl genspezifischer Primer A
1,5 µl	10 pmol/ µl genspezifischer Primer B
9,0 µl	10 X LA PCR-Puffer
1,0 µl	cDNA aus der Reversen Transkription
0,5 µl	TaKaRa LA TAQ HS Polymerase
4,0 µl	dNTPs
<u>33 µl</u>	<u>RNAse freies Wasser</u>
<u>50 µl</u>	

Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler für 5 Min bei 95 °C aktiviert. Danach folgte ein dreistufiger Zyklus, der aus der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation bestand. Die Denaturierung erfolgte für 15 s bei 94 °C, das Annealing für 1 Min bei 60 °C und die Elongation für 1 Min bei 72 °C. Der letzte Elongationsschritt wurde auf 10 Min verlängert und die Proben anschließend auf 10 °C abgekühlt. Dieser Zyklus wurde 40 Mal durchlaufen und die Proben danach bei 4 °C gelagert bis zur weiteren Verwendung. Das Ergebnis waren doppelsträngige DNA-Moleküle.

Reaktionsschritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
Denaturierung	15	94	
Annealing	60	60	40
Elongation	60	72	

2.2.4.2 Phusion-PCR zur Isolierung des hBEST1-His-Inserts

Für die Umklonierung des *hBEST1*-Inserts in Expressionsvektoren und die Mutagenese der *hBEST1*-Vektoren wurde eine Phusion-Polymerase verwendet. Es kommt das gleiche Prinzip, welches in Kapitel 2.2.4 beschrieben wurde, zum Einsatz. Der PCR ging ein initialer Denaturierungsschritt bei 98 °C für 30 s in einem Thermocycler voraus. Im Anschluss fand ein dreistufiger Zyklus statt, der im Folgenden beschrieben wird:

Reaktionsschritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
Denaturierung	10	98	
Annealing	30	58-68	35
Elongation	240	72	

Die oben aufgeführten Schritte wurden 35 Mal wiederholt, wobei der letzte Elongationsschritt 10 Min dauerte. Danach wurden die Proben auf 10 °C heruntergekühlt und danach bei 4 °C gelagert bis zur weiteren Verwendung.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

12,4 µl	dd H ₂ O
4,0 µl	5X Puffer GC
1,0 µl	dNTP (10 mM)
1,0 µl	Primer A
1,0 µl	Primer B
0,2 µl	PhusionHotStart DNA-Polymerase
<u>1,0 µl</u>	<u>Plasmid (20 ng/µl)</u>
<u>30,6 µl</u>	

2.2.4.3 Long Range-PCR zur Mutagenese von Plasmiden

Das Einfügen von Mutationen in einen Vektor erfolgte mit eigens dafür designten Primern nach dem Protokoll für die Phusion-Polymerase.

Die Mutagenese-PCR ist eine zielgerichtete Methode eine Mutation in eine DNA-Sequenz einzufügen. Man benötigt eine doppelsträngige Plasmid-DNA und einen mutierten und einen nicht mutierten Primer. Die Missense-Mutation in dem mutierten Primer wurde durch ein mutationsspezifisch ausgetauschtes Nukleotid kreiert, welches sich in der Mitte des Primers, umgeben von komplementären Nukleotiden, befand. Die doppelsträngige Plasmid-DNA wurde während der PCR denaturiert und die Primer lagerten sich nicht überlappend sondern Rücken an Rücken in Strang- und Gegenstrangrichtung an die DNA an. Die Primer, die am 5'-Ende phosphoryliert waren, produzierten lineare DNA-Stränge mit stumpfen, 5'-phosphorylierten Enden. Diese konnten direkt in eine Ligation eingesetzt werden. Der Reaktionsansatz wurde im vorherigen Kapitel beschrieben.

2.2.5 Generierung eines 3'-Adenosin-Überhangs

Da die bei der PCR entstandenen DNA-Moleküle stumpfe Enden hatten, musste für eine anschließende TOPO-TA-Klonierung (siehe 2.2.6) ein 3'-Adenosin-Überhang generiert werden. Dieser Überhang wurde mit einer Taq-Polymerase synthetisiert.

Der Ansatz für diese Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

7,0 µl PCR-Produkt
0,75 µl Taq-Puffer
0,25 µl MgCl₂
1,0 µl Taq-Polymerase
0,2 µl Adenosintriphosphat (ATP)
0,8 µl H₂O
10,0 µl

Der Ansatz wurde für 20 s auf 70 °C erhitzt.

2.2.6 TA-Klonierung in den pCR®2.1 TOPO®-Vektor

Die DNA-Klonierung dient der Verknüpfung der Ziel-DNA mit einem Replikon, sodass eine rekombinante DNA entsteht. Das Replikon ist eine DNA-Sequenz, die eine unabhängige DNA-Replikation vermitteln kann. So wird bei Übertragung der rekombinanten DNA auf eine Wirtszelle auch die Ziel-DNA repliziert, wenn das Replikon in der Zelle replizieren kann. Die TA-Klonierung basiert auf dem Prinzip der Vaccina Topoisomerase I. Dieses Enzym hat eine hohe Sequenzspezifität und bindet an doppelsträngige DNA. Es spaltet die Phosphodiesterbindung eines DNA-Stranges nach einem 5'-Element (C/T)CCTT) und aktiviert dieses. Die durch diese Spaltung freigewordene Energie nutzt die Topoisomerase I, um über eine 3'-Phosphotyrosylbindung kovalent an das 3'-Phosphat des geschnittenen Endes zu binden. Der pCR®2.1 TOPO®-Vektor besitzt zwei benachbarte solche Schnittstellen. Die beiden Enden besitzen einen Thymidinüberhang, an den die Topoisomerase I gebunden bleibt, sodass eine Selbstligation unterbunden wird. Reagiert die Phosphotyrosylbindung jedoch mit einem 5'-Hydroxylrest eines DNA-Stranges, kommt es zur Freisetzung der Topoisomerase I und zur Ligation des DNA-Stranges mit dem Vektor. Da die PCR-Produkte einen Desoxyadenosinüberhang am 3'-Ende tragen und der in dem Kit mitgelieferte Vektor einen Desoxythymidinüberhang trägt, können die PCR-Produkte und der Vektor effizient aneinander binden und ligiert werden.

Reaktionsansatz:

1,5 – 2 µl PCR-Produkt
1,0 µl Dilute salt solution
1,0 µl pCR®2.1 TOPO-Vektor
Ad 10,0 µl Aqua bidest.

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde er auf Eis gelagert.

2.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen

Wenn Vektoren mit einer einzelnen Restriktionsendonuklease linearisiert werden, entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligiert werden können. Um diese Selbstligation zu verhindern, wurden die Vektoren vor der Ligation (2.2.8) dephosphoryliert. Dabei wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden mittels einer Phosphatase abgespalten, sodass eine Selbstligation nicht mehr möglich war.

Der Reaktionsansatz für dieses Experiment setzte sich wie folgt zusammen:

10,0 µl	Expressionsvektor
1,0 µl	Antarktische Phosphatase
1,5 µl	Antarktische Phosphatase-Reaktionspuffer
2,5 µl	Aqua bidest.
<hr/>	
15 µl	

Der Reaktionsansatz wurde 15 Min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss 5 Min bei 65 °C im Heizblock inaktiviert.

2.2.8 Ligation

Als Ligation bezeichnet man das Zusammenfügen von zwei linearisierten DNA-Molekülen mittels einer Ligase. Die Ligase ist ein Enzym, welches von Bakterien bei der Reparatur und Replikation der DNA verwendet wird. Die hier eingesetzte T4-DNA Ligase stammt aus E. coli Bakterien, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert wurden. Das Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen anliegenden 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphorylgruppen bei DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Reaktion erfolgte entweder bei 37°C für eine Stunde oder über Nacht bei 37°C.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

präparationsspezifische Menge	Plasmid-DNA
1,0 µl	T4-Ligase
2,0 µl	10 X T4-Ligase Puffer
Ad 20 µl	Aqua bidest.

2.2.9 Restriktionsendonukleaseverdau

Durch Restriktionsendonukleasen können Phosphodiesterbindungen eines doppelsträngigen DNA-Moleküls hydrolytisch gespalten werden. Dabei entstehen DNA-Fragmente verschiedener Größe. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen

(Tabelle 4) gehören zu den Typ-II-Restriktionsendonukleasen. Diese erkennen zumeist palindromische DNA-Sequenzen und spalten die DNA an definierten Positionen innerhalb der Erkennungssequenz. Dabei entstehen Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende.

Der Restriktionsendonukleaseverdau diente der Überprüfung der Insertion des DNA-Fragmentes in die Vektor-DNA, der Herstellung eines linearisierten Expressionsvektors sowie spezifischer DNA-Fragmente, die anschließend kloniert werden konnten.

Ein Standardreaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl	Restriktionsendonuklease-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease
1 µl	Plasmid- DNA
7 µl	Aqua bidest.
<hr/>	
10 µl	

Der Reaktionsansatz wurde 1 h oder über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

2.2.10 Quantifizierung von Biomolekülen

2.2.10.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes mit dem Photometer

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden Absorptionsmessungen in einem Photometer durchgeführt. Die Intensität eines Lichtstrahls nimmt durch die Absorption der elektromagnetischen Strahlung beim Durchtreten einer transparenten Flüssigkeit ab. Diese Abschwächung (Extinktion) ist umso größer, je höher die Konzentration der gelösten Teilchen ist. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz und der durchlaufenen Schichtdicke (Lambert-Beersches Gesetz). Die Nukleinsäurekonzentration wird im Vergleich zum Lösungsmittel, dessen Extinktion als Nullwert gemessen wird, berechnet. Da die Plasmid-DNA in Aqua bidest. gelöst wurde, wurde die Absorption gegen Aqua bidest. als Lösungsmittel gemessen.

Zunächst wurde eine 1:10 Verdünnung der durch Aufreinigung gewonnenen DNA hergestellt (1 µl DNA + 9 µl Aqua bidest.). Danach wurde eine Quartzküvette mit 10 µl reinem Lösungsmittel befüllt und das Photometer auf das Lösungsmittel (Aqua bidest.) kalibriert. Anschließend wurden 10 µl der Lösung in eine Quartzküvette einpipettiert und diese in die Messkammer eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA. Zur Reinheitsbestimmung der Probe wurde auch ihre Proteinkonzentration bei 280 nm gemessen. Diese sollte möglichst niedrig sein. Der Quotient aus den Messwerten bei 260 nm

und 280 nm (OD260 nm/ OD280 nm) sollte daher über 1,8 liegen. Um genügend Material für eine Sequenzierung zu haben, sollte die DNA-Konzentration mindestens 10 µg/ml betragen.

2.2.10.2 Coomassie- Plus (Bradford)-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an ein Protein führt zu einer Änderung des Absorptionsmaximums des Färbemittels von 365 nm zu 595 nm. Diese Zunahme ist bei 595 nm messbar. Die Bindung des Färbemittels geht mit einer Reaktionszeit von ca. zwei Minuten schnell von statten. Kationen beeinflussen die Reaktion kaum, während große Mengen an SDS und Triton X-114 die Reaktion stören (Bradford, 1976). Da für die Extraktion der Proteine Triton X-114 zum Einsatz kam, wurden die Proben vor dem Bradford-Assay mit 17000 g zentrifugiert, so dass sich das Triton X-114 unten in dem Schnappdeckelgefäß absetzen konnte. Die hydrophile Phase wurde abgenommen und in ein neues Schnappdeckelgefäß überführt. Auf diese Weise konnte der störende Einfluss des Detergenz eliminiert werden. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt, indem die Absorption der Probe mit der Absorption einer Standardreihe bekannter Proteinkonzentration, die neben der unbekanntenen Probe gemessen wird, verglichen wurde.

In einer Einmalküvette wurden 750 µl Bradford-Reagenz (Serva) vorgelegt und mit je 25 µl Probe gemischt. Die Küvetten wurden invertiert und für fünf Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer bei 595 nm. Dieses wurde mit einer Nullmessung mit Bradford-Reagenz in Lysis- bzw. Elutionspuffer der Proteinprobe eingestellt. Danach wurden die Proben gemessen.

2.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte aus ökonomischen Gründen über die Firma SeqLab Sequence Laboratories GmbH in Göttingen nach der ExtendedHotShot Methode. Für die Sequenzierung wurden je Ansatz 7 µl Aqua bidest., 5 µl Plasmid-DNA und 3 µl des jeweiligen Primers in einem 1,5 ml Schnappdeckelgefäß eingeschickt.

2.2.12 Elektrophorese

2.2.12.1 Die denaturierende, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli

Durch die SDS-PAGE werden die Bestandteile eines Proteingemisches entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Dafür werden die Eigenschaften der Proteine, z.B. Faltung

und Ladung maskiert. Die Zugabe des anionischen Tensides SDS führt dazu, dass die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Bindungen innerhalb eines Proteins nicht mehr aufrechterhalten werden können und Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur verloren gehen, das Protein wird also linearisiert. Es wird außerdem von dem stark negativ geladenen SDS umhüllt, was die Eigenladung des Proteins überdeckt. Daher entspricht die Laufstrecke der resultierenden Bande der Größe des Proteins (Friedrich Lottspeich, 2006).

Die Gelmatrix eines Polyacrylamidgels entsteht durch die Polymerisation von Bisacrylamid und Acrylamid. Acrylamid polymerisiert zu langen Ketten, während Bisacrylamid für die benötigte Quervernetzung der Ketten sorgt. Es entsteht also ein Netz, dessen Porengröße sich nach dem Verhältnis von Bisacrylamid zu Acrylamid richtet. Das Polymerisieren ist eine Radikalreaktion, die durch APS angestoßen wird, welches die freien Elektronen liefert. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Zugabe von TEMED (Friedrich Lottspeich, 2006).

1970 modifizierte Lämmli (Lämmli UK., 1970) die diskontinuierliche Gelelektrophorese, was den Vorteil birgt, scharfe Proteinbanden zu erhalten. Sie setzt sich aus einem Sammelgel, in dem die Proteine zunächst vor Eintritt in das Trenngel fokussiert werden und einem Trenngel, in dem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, zusammen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorgegossene Gele mit einem Polyacrylamidgradienten von 4 - 12% der Firma Serva benutzt.

Die Gele wurden in eine Hoefer SE mini Kammer eingespannt und diese an eine Umwälzpumpe mit Kühlung angeschlossen. Die Kammer wurde im Anschluss mit 300 ml 1 X SDS-Laufpuffer (2.1.10) befüllt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 5X Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 Min bei 95 °C denaturiert. Der Probenpuffer sorgt dafür, dass der pH-Wert der Proben über einen großen Temperaturbereich konstant bleibt und stabilisiert die Aspartyl-Prolyl-Peptidbindungen. Die Zugabe von reduzierenden Agenzien, wie z.B. β -Mercaptoethanol (β -ME) oder Dithiothreitol (DTT), sorgt für die Spaltung von Disulfidbrücken und verhindert so weitere Störungen, die durch Proteinfaltungen entstehen. Danach wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Proteinmasse wurde parallel zu den zu analysierenden Proben ein gefärbter Proteinstandard auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde mit 1X SDS-Laufpuffer bei 300 V, 10 °C für 40 Min durchgeführt.

2.2.12.2 Semi Dry Blotting

Für den spezifischen Nachweis bestimmter Proteine wurde ein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt. Dazu mussten die Proteine, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, nach Beendigung der Gelelektrophorese auf eine feste Trägermembran übertragen und fixiert werden. Dazu wurden die aufgetrennten Proteine mittels Semi-Dry-Blotting auf eine

Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurden zwei dicke und vier dünne Filterpapiere sowie die Nitrocellulosemembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten, mit 1X Transferpuffer befeuchtet und mittels einer Pinzette übereinander geschichtet (Abbildung 2-7).

Um die Bildung von Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen zu vermeiden, wurden nach dem Auflegen jeder Lage mit einem Roller die Luftblasen weggedrückt. Die Übertragung erfolgte bei 200 mA und Raumtemperatur für 40 Min.

Zur Kontrolle der Übertragung und zur zusätzlichen Fixierung der Proteine auf der Membran wurde nach dem Blotten die Membran in Ponceau S Lösung (0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure) geschwenkt, welche Proteine unspezifisch rot anfärbt. Der Hintergrund wurde mit Aqua dest. entfernt.

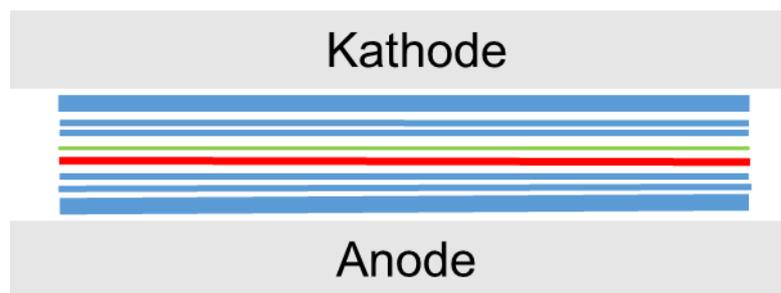


Abbildung 2-7: Aufbau einer Blottingapparatur.

Blaue Linien Filterpapiere; Rote Linie: Membran; Grüne Linie: Gel.

2.2.12.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Standardmethode, um Bio-Moleküle unterschiedlicher Größe aufzutrennen. Sie findet daher auch in der Größenanalyse von DNA-Fragmenten Anwendung. Die Methode macht sich das Wanderungsverhalten geladener Moleküle in einem elektrischen Feld zunutze. Da die DNA-Moleküle in ihrem Phosphatrückgrat negative Ladungen tragen, wandern sie im elektrischen Feld von der negativen Kathode zur positiven Anode. Die Agarose bildet ein Netzwerk aus Poren, welches die DNA-Moleküle durchwandern müssen und dient daher als Filter. Kürzere DNA-Moleküle wandern in diesem Netzwerk schneller als längere Moleküle. Moleküle gleicher Größe sammeln sich an definierten Punkten entlang der Laufrichtung und bilden im Gel Banden, die mittels Ethidiumbromid (Etbr) im UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

Es wurden Gele gegossen, die 1% oder 2% Agarose enthielten. Die 1%igen Gele wurden zur Auftrennung großer DNA-Fragmente im Kilobasenpaar-Bereich (kb-Bereich) verwendet und die 2%igen zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten im zweistelligen Basenpaar-Bereich (bp-Bereich). Es wurden kleine und mittelgroße Gele eingesetzt. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

		Kleines Gel	Mittelgroßes Gel
Agarose-Gel 1%	1% (w/v) Agarose	0,5 g	1 g
Agarose-Gel 2%	2% (w/v) Agarose	1 g	2 g
	1 X TBE Puffer	50 ml	100 ml
	Ethidiumbromid	4 µl	8 µl

Die Ansätze wurden in der Mikrowelle bei 700 W erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Danach wurde die Gewichts­differenz des verdampften Wassers mit Aqua dest. ausgeglichen. Der Lösung wurden 4 bzw 8 µl Ethidiumbromid (10 mg / ml) zugesetzt. Danach wurde das Gel in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen und bei 4 °C aushärten gelassen. Die Proben wurden mit jeweils 2 µl 5 X PCR-Probenpuffer je 5 µl Probe versetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in die Laufkammer gesetzt und mit 1 X TBE-Puffer überschichtet. Dann wurden die einzelnen Proben sowie 7,5 µl Größenmarker in je eine Geltasche pipettiert. Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt und nach 75 Min wurde das Gel unter der UV-Lampe dokumentiert.

Das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert alle 10 bp zwischen die Nukleotide und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht. So konnten die DNA-Fragmente als Banden definierter Größe nach der Elektrophorese im Gel sichtbar gemacht werden.

2.3 Zellkulturtechnik

2.3.1 Bakterienkulturen

2.3.1.1 Suspensionskultur

E.coli-Bakterien wurden in Übernachtskulturen mit LB-Medium angezchtet. Die Kultur befand sich dabei am nächsten Morgen in der lag-Phase, in der die Bakterienzahl in der Kultur konstant blieb. Für die jeweiligen Anwendungen wurden verschiedene Kulturvolumen eingesetzt. Das Medium wurde aus Luria-Broth Pulvermedium (Tabelle 14) angesetzt. Je nach verwendetem Bakterienstamm und Plasmidvektor wurden dem Medium Selektionsantibiotika zugesetzt (Tabelle 14). Die Kultur wurde als Übernachtskultur für 16 h bei 37 °C und 180 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert.

Für Anwendungen, bei denen sich die Bakterien in der Teilungsphase befinden mussten, wurde diese Kultur für 2 - 3 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Danach wurde in regelmäßigen Abständen (Generationszeit = 20 Min) die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) photometrisch gemessen bis eine OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 erreicht war.

2.3.1.2 Ausstrichkultur

Zur Isolation einzelner Bakterienklone wurde eine Bakteriensuspension auf Agarosegelplatten ausgestrichen. Der Nährboden bestand aus LB-Medium mit 1,5 g / 500 ml Agarosezusatz (Tabelle 14) und dem Selektionsantibiotikum Ampicillin (1 µg / ml) und war in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser eingegossen.

Der Ausstrich erfolgte entweder aus einer Suspension (ca. 100 µl) mit Hilfe eines Spatels oder als Vereinzlungsausstrich mit einer Impföse. Nach einer Inkubationszeit von 16 h lagen einzelne Bakterienklone vor, die isoliert und weiterverarbeitet werden konnten.

2.3.1.3 Herstellung elektrokompetenter E.coli-Bakterien

Aus einem Glycerolstock (2.3.1.6) einer XL1Blue E.coli Kultur wurden 5 µl entnommen und in einem 15 ml Falcon-Tube in 5 ml LB-Medium mit Tetracyclin (10 µg / µl) eine Übernachtskultur (2.3.1.1) durchgeführt. Mit 2 ml dieser Übernachtskultur wurde in einem Erlenmeyer-Kolben eine 100 ml Bakterienkultur unter Tetracyclinselektion angeimpft.

Wenn eine OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 erreicht war, wurde die Kultur in zwei 50 ml Falcon-Tubes umgefüllt und für 30 Min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 5 Min bei 5.100 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml eiskalter 1 mM HEPES-Lösung resuspendiert. Dann wurde die Suspension noch einmal mit den vorgenannten Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 25 ml eiskalter 1 mM HEPES-Lösung resuspendiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den oben genannten Bedingungen, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut für 5 Min bei 4 °C und 5.100 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei den genannten Bedingungen und nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 50 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt und diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3.1.4 Transformation in elektrokompetente E. coli-Bakterien

Die rekombinante DNA wurde mittels Elektroporation in die elektrokompetenten XL1Blue-Zellen eingebracht.

Dabei wurden die Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen mit hoher Feldstärke ausgesetzt. Dadurch entstehen in der Plasmamembran der Zellen kurzzeitig Poren, durch welche die DNA in die Zellen gelangen kann.

Es wurden 2 µl DNA aus einer Ligation (2.2.8) zu einem 50 µl Aliquot elektrokompetenter E.coli gegeben und das Gemisch für 15 Min auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen in eine 0,1 cm Küvette gegeben und im Elektroporator elektrotransformiert. Direkt im Anschluss wurde 1 ml auf 37 °C angewärmtes LB-Medium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 90 Min bei 180 rpm und 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 1.000 g für 5 Min abzentrifugiert. Von dem Überstand wurden 700 µl verworfen und das Pellet in den verbliebenen 300 µl LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer Ausstrichkultur (2.3.1.2) über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert.

2.3.1.5 Isolation selektierter Bakterienkolonien

Auf den über Nacht bei 37 °C inkubierten Ausstrichkulturen (2.3.1.2 und 2.3.1.4) wuchsen vereinzelte Kolonien. Da die Agarplatten mit Ampicillin versetzt waren, konnten nur die Zellen wachsen, die Plasmid-DNA mit einem Resistenzgen gegen Ampicillin enthielten. Diese wurden auf dem Boden der Petrischale durchnummeriert. Die ausgewählten Klone wurden mittels einer Pipettenspitze in eine 5 ml Suspensionskultur (2.3.1.1) mit Ampicillin isoliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

2.3.1.6 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Um Bakterienkulturen langfristig aufheben zu können, wurden Glycerinstocks angelegt. Dafür wurden 800 µl einer Suspensionskultur (2.3.1.1) mit 200 µl Glycerin gemischt und für einige Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Kulturen bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Säugetierzellkultur

2.3.2.1 Kultivierung adhärenter Säugerzelllinien

Im Rahmen des Projektes wurde mit vier adhärenen Säugerzelllinien gearbeitet, HEK293T/17-Zellen, MDCK-II-Zellen, MDCK Flip-In- und MDCK-Best-Zellen. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden in einer Klasse 2 Sterilwerkbank mit sterilen Glaspipetten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm unter Zugabe von 10 ml DMEM⁺⁺⁺-Medium und Selektionsantibiotikum, wo nötig. Die Zellen wurden bei 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit bei 37 °C kultiviert. Nachdem die Zellen bei Sichtkontrolle eine Konfluenz von 95-100% erreicht hatten, wurden sie passagiert.

2.3.2.2 Passagieren adhärenter Säugetierzelllinien

Vor der Passage wurde das verbrauchte Nährmedium abgezogen und verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 ml 1 X PBS (sterilfiltriert) gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Accutaselösung überschichtet und für 10 - 15 Min bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion der Accutase zu stoppen, wurden 8 ml frisches Nährmedium zu den abgelösten Zellen gegeben. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml in eine neue Petrischale überführt, mit 9 ml frischem Nährmedium und Selektionsantibiotikum, wo nötig, versetzt und mit den in 2.3.1.3 genannten Bedingungen weitergeführt. Die restlichen 9 ml der Zellsuspension wurden verworfen.

2.3.2.3 Kryokonservierung von adhärenenten Säugetierzelllinien

Um die Zelllinien für einen längeren Zeitraum einzulagern, wurden sie kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen von einer 100% konfluent bewachsenen Petrischale wie in 2.3.2.2 beschrieben abgelöst. Nach dem Stoppen der Accutasereaktion wurden die Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 Min bei 125 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) resuspendiert. Diese Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.3.2.4 Auftauen adhärenter Säugetierzelllinien

Bei Bedarf wurde ein Kryoröhrchen eingefrorene Zellkultur aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der vollständige Inhalt des Röhrchens wurde zusammen mit 9 ml frischem Nährmedium in eine Petrischale gegeben. Nach 24 h wurde ein vollständiger Mediumwechsel mit 10 ml DMEM⁺⁺⁺ vorgenommen, um abgestorbene Zellen und Reste des Einfriermediums zu entfernen.

2.3.2.5 Transfektion adhärenter Säugetierzelllinien

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Dabei unterscheidet man zwei Arten der Transfektion, zum einen die transiente Transfektion, bei der die eingebrachte Fremd-DNA durch Teilung der Wirtszelle mittelfristig in deren Nachkommen verloren geht und die stabile Transfektion, bei der die eingebrachte Fremd-DNA dauerhaft im Wirtsgenom integriert wird.

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Fremd-DNA mittels Lipofektion in die jeweiligen Wirtszellen (siehe Tabelle 18) eingebracht. Unter Lipofektion versteht man die Komplexierung der negativ geladenen Nukleinsäuren mit kationischen Liposomen. Die Liposomen fusionieren

nach erfolgter Endozytose mit der Endosomenmembran und setzen die Vektor-DNA in die transfizierte Zelle frei.

Tabelle 18: Überblick über die Transfektionen verschiedener eukaryotischer Zelllinien

Zellen	transient	stabil	10 cm Schale	6-Loch-Platte	48-Loch-Platte	Polar	Unpolar
MDCK II	X				X	X	
MDCKFI		X		X			X
MDCK- Best	X			X	X	X	X
HEK293T/17	X		X				X

2.3.2.5.1 Transfektion mit dem Lipofectamine LTX Kit

Die über eine Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.2.2) gewonnene Plasmid-DNA pFRT/lacZeo wurde in MDCK-II-Zellen transfiziert. Dazu wurde ein 1,5 ml Gefäß mit 500 µl nicht supplementiertem DMEM (DMEM⁻) und 4 µg Plasmid-DNA befüllt. Als Negativkontrolle diente DMEM⁻ und als Postitivkontrolle 500 µl DMEM⁻ mit 4 µg GFP-Vektor (pEGFP-N1, 2.1.7.5). Die Proben wurden resuspendiert. Anschließend wurden 7,5 µl PLUSTM Reagent zu den Proben gegeben. Nach erneuter Resuspendierung erfolgte ein Inkubationsschritt von 5 Min bei Raumtemperatur. Danach wurden 22,5 µl Lipofectamine hinzugefügt, die Proben resuspendiert und für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium (DMEM⁺⁺⁺) in der 6-Lochplatte gewechselt. Dann wurden die DNA-Lipid-Komplexe tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Platte für 5 Min bei 50 rpm auf dem Schüttler inkubiert und wie in 2.3.1.3 beschrieben kultiviert. Nach 24 h wurde die Transfektionseffizienz durch Auswertung der GFP-exprimierenden Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

2.3.2.5.2 Transfektion mit dem K2[®] Transfektionssystem von Biontex

Da die für die Transfektion verwendeten eukaryotischen Zelllinien über ein zelleigenes Immunsystem verfügen, können sie zellfremde Substanzen wie z.B. Lipopolysaccharide, bakterielle oder virale Nukleinsäuren und Proteine detektieren und gegen das Eindringen von potentiellen Pathogenen Abwehrmaßnahmen ergreifen. Deshalb wurde für die Transfektionen, mit Ausnahme der Generierung der MDCKFI-Zelllinie, das K2[®] Transfektionssystem von Biontex verwendet, da dieses den K2[®] Multiplier enthält, der die Fähigkeit der Zellen fremde Nukleinsäuren zu detektieren einschränkt und so zu besseren Transfektionseffizienzen führte.

Für die transienten Transfektionen im 48-Lochformat wurden jeweils 0,5 µg Vektor-DNA, für die Transfektion von Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser jeweils 20 µg Vektor-DNA, für die Transfektion im 6-Lochformat jeweils 4 µg und für die stabile Transfektion 2 µg Vektor-DNA verwendet.

Generell wurde zunächst das Nährmedium gegen entsprechende Mengen frisches Nährmedium mit Multiplier ausgetauscht (Tabelle 19) und für weitere 2 h weiterkultiviert. Danach wurde in einem Schnappdeckelgefäß DMEM⁻⁻⁻ vorgelegt und die Vektor-DNA darin gelöst. In einem weiteren Schnappdeckelgefäß wurden DMEM⁻⁻⁻ und das Transfektionsreagenz gemischt. Die DNA-Lösung wurde zum Transfektionsreagenz gegeben und nach Resuspendierung für 15 - 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium bestehend aus der jeweiligen Vektor-DNA und dem Transfektionsreagenz auf die Zellen gegeben.

HEK293T/17-Zellen: Es wurden 1,5 ml HEK293T/17-Zellsuspension, was einer Zellzahl von ca. 1,5 Mio. Zellen entsprach, in eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser gegeben und für 48 h wie in 2.3.2.1 beschrieben kultiviert bis eine Konfluenz von 70 - 80% erreicht war. Danach wurde das Nährmedium abgezogen und verworfen und mit den in Tabelle 19 beschriebenen Bedingungen und nach den oben genannten Angaben weiter verfahren. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium abgezogen und verworfen und die Zellen nach Überschichtung mit 10 ml DMEM⁺⁺⁺ für weitere 48 h kultiviert.

MDCK-II-Zellen: Damit sich die MDCK-II-Zellen epithelialisieren konnten, wurden sie auf Filtern, die über einen Plastikrahmen in die Kavität eingehängt wurden (Inserts), angezogen. Für das Experiment wurden 10 µl Zellsuspension, was einer Zellzahl von ca. 10.000 Zellen entsprach, auf die Inserts gegeben und mit 500 µl DMEM⁺⁺⁺ für 24 h wie unter 2.3.1.3 beschrieben kultiviert bis eine Konfluenz von ca. 70 - 80% erreicht war. Danach wurde wie in 2.3.2.5 beschrieben weiter verfahren (siehe auch Tabelle 19). Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium abgezogen und durch 500 µl frisches DMEM⁺⁺⁺ ersetzt. Die Zellen wurden im Anschluss noch für weitere 24 h kultiviert.

MDCK-II^{BEST}-Zellen (6-Lochformat): Es wurden 500 µl MDCK-II^{BEST}-Zellsuspension, was einer Zellzahl von ca. 500.000 Zellen entsprach, je Kavität einer 6-Lochplatte ausgesät und für 24 h in DMEM⁺⁺⁺ unter den in 2.3.2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Danach wurde nach Herstellerangaben und mit den in Tabelle 19 genannten Bedingungen weiter verfahren. 24 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium verworfen und durch 2 ml frisches DMEM⁺⁺⁺ ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 48 h weiterkultiviert.

MDCK-II^{BEST}-Zellen (48-Lochformat): Es wurden 100 µl MDCK-II^{BEST}-Zellsuspension, was einer Zellzahl von ca. 100.000 Zellen entsprach, je Kavität einer 24-Lochplatte auf Inserts ausgesät und für 24 h in Selektionsmedium unter den in 2.3.2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Danach wurde nach Herstellerangaben und mit den in Tabelle 19 genannten Bedingungen weiter verfahren. 12 - 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert (siehe 2.3.2.7).

Tabelle 19: Transfektionsbedingungen

Zelllinie	DMEM ⁺⁺⁺ (µl)	K2 [®] Multiplier (µl)	K2 [®] Transfektions- reagenz (TR, µl)	DMEM ⁻⁻ TR / DNA (µl / µl)	Plasmid (µg)
MDCK II	250	5	2,5	15 / 15	0,5
MDCK-Best (48 well)	250	5	2,5	15 / 15	0,5
MDCK-Best (6 well)	2.000	40	20	130 / 130	4,0
HEK293T/17	10.000	125	30	500 / 500	20

DMEM⁻⁻: nicht supplementiertes DMEM, DMEM⁺⁺⁺: supplementiertes DMEM

2.3.2.6 Bestimmung der Minimalkonzentration für Selektionsantibiotika

Um transfizierte Eukaryontenzellen von nicht transfizierten Eukaryontenzellen zu selektionieren, trugen die Plasmide eine Antibiotikaresistenz gegen Zeocin und Hygromycin. Da die Zelllinien verschieden empfindlich gegen diese Antibiotika waren, musste für jede Zelllinie die Mindestkonzentration für das jeweilige Selektionsantibiotikum bestimmt werden. Dafür wurden von einer konfluent bewachsenen Petrischale MDCK-II- und MDCK Flip-In-Zellen passagiert und auf jeweils 7 Petrischalen aufgeteilt. Den Zellen wurde über Nacht die Gelegenheit gegeben wieder adhärent zu werden und eine Konfluenz von ca. 25 % zu erreichen. Am nächsten Tag wurde das Nährmedium durch frisches Selektionsmedium (DMEM⁺⁺⁺ mit Selektionsantibiotikum) ersetzt, dem verschiedene Konzentrationen der Selektionsantibiotika Zeocin (für MDCK II) und Hygromycin B (für MDCK Flip-In) zugesetzt waren. Die Selektionsmedia wurden alle drei bis vier Tage gewechselt und die Zahl der überlebenden Zellen in regelmäßigen Intervallen beobachtet. Diejenige Konzentration, die alle Zellen innerhalb von ein bis zwei Wochen abtötete, stellte die Minimalkonzentration dar, die in den weiteren Experimenten zur Selektion und Weiterkultivierung verwendet wurde.

2.3.2.7 Fixieren von adhärennten Säugetierzellen

Für die Fixierung wurde das Nährmedium von den auf Inserts kultivierten Zellkulturen abgezogen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1X PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Danach wurden 100 µl 4%ige Paraformaldehydlösung auf die Zellen pipettiert und für 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Fixativ abgezogen und verworfen und die Zellen dreimal für jeweils 10 Min bei Raumtemperatur mit je 100 ml 1 X PBS gewaschen und im Anschluss entweder direkt gefärbt (2.3.7) oder bei 4 °C gelagert.

2.3.3 Herstellung eines polyklonalen Antiköpers im Huhn

Vögel schützen, vergleichbar wie die Säugetiere über die Kolostralmilch, ihre Nachkommen mit polyklonalen Antikörpern. Zu diesem Zweck wird ein Teil der gebildeten Antikörper vom Blut in den Eidotter übertragen. Diese vitellinen Antikörper werden als IgY (Y=Yolk) bezeichnet. Eine für humanes Bestrophin 1 spezifische Aminosäuresequenz (AS204-220:PILLQSELLNEMETLRTQ) zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne (TMD) wurde als Antigen ausgewählt. Das entsprechende Oligopeptid wurde generiert und eine Legehähne von einem kommerziellen Anbieter (Davids, Regensburg) damit immunisiert. Der Antikörper (BEST1-N204-220) wurde aus dem Eidotter isoliert und aufgereinigt.

2.3.4 Aufreinigung von Proteinen über den His-Tag

Für die Darstellung von Interaktionspartnern His-getaggter Proteine wurden diese aus einer Proteinpräparation (2.2.1.4) mit den gebundenen Interaktionspartnern über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Dazu wurden 2 ml der Proteinproben (2.2.1.4) in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, mit 500 µl Ni-NTA-Agarose versetzt und für 24 h auf einem End-over-end-Schüttler bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch auf eine kommerziell erhältliche Säule von Qiagen gegeben und der Durchlauf in einem 2 ml Schnappdeckelgefäß auf Eis aufgefangen. Es schlossen sich mehrere Waschschrte mit einem 10 mM Imidazol enthaltenden Waschpuffer an. Nach jedem Waschschrte wurde ein Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt, bis sich kein oder nur noch eine geringfügige Menge Protein in der Probe befand. Daran schlossen sich die Elutionsschrte mit einem 500 mM-Imidazol enthaltenden Elutionspuffer an. Auch hier wurde nach jedem Elutionsschrte ein Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

2.3.5 Immunochemischer Nachweis definierter Proteine auf Nitrocellulosemembranen

Im Anschluss an den Western-Blot (2.2.12.2) wurde die Membran in 10% Magermilchpulver-TBS-Lösung für 30 Min, oder in 5% Magermilchpulver-TBS-Lösung für 60 Min bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert, um unspezifische Bindestellen an der Membran zu maskieren. Auf diese Weise wurden alle unspezifischen Bindungsstellen für die eingesetzten Antikörper abgesättigt und die Renaturierung einiger Epitope gefördert. Danach wurde die Membran dreimal in 1X TBS geschwenkt, um Milchpulverreste zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Antikörperkonzentrationen für die SDS- PAGE

Antikörper	Konzentration	Dauer; Temperatur (h; °C)
Huhn anti Bestrophin 1 (Best1-N204-N220)	1:2000	ün; 4 °C
Ziege anti Bestrophin 1 (C-14)	1:200	2 h; RT
Maus anti Actin	1:2000	ün; 4 °C
Anti His-Tag HRP konjugiert	1:15000 + 2% Tween 20	ün; 4 °C
Anti Myc-Tag HRP konjugiert	1: 2000	ün; 4 °C
Anti Huhn IgY HRP konjugiert	1:750	1 h; RT
Anti Ziege IgG HRP konjugiert	1:10000	1 h; RT
Anti Maus IgG HRP konjugiert	1:10000 + 1% MP	1 h; RT

MP: Milchpulver; ün: über Nacht, RT: Raumtemperatur

Nach dem Primärantikörper wurde die Membran dreimal mit 1X TBS jeweils für 10 Min gewaschen und wenn nötig, mit dem Sekundärantikörper in 1 X TBS für 60 Min bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert. Der Sekundärantikörper erkennt Domänen des Primärantikörpers und bindet an diesen. Eine enzymatische Markierung (Meerrettich-Peroxidase) ist an den Sekundärantikörper gekoppelt, die unter Zugabe eines Substrats die Bindestelle auf dem Blot markiert. Zusätzlich zur Signalverstärkung über den Umsatz vieler Substratmoleküle durch die enzymatische Markierung, kann die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an ein Molekül des Primärantikörpers zu einer Signalverstärkung führen. Danach wurde die Membran wiederum dreimal mit 1X TBS jeweils 10 Min auf dem Taumelschüttler gewaschen und dann mit der ECL (enhanced Chemiluminescence) Detektionslösung für drei Minuten bei Raumtemperatur überschichtet. Das Detektionsprinzip beruht auf der Produktion von Licht durch eine chemische Reaktion (Chemilumineszenz). Diese liefert die Energie zur Anhebung von Elektronen in den

angeregten Zustand. Der Rückfall dieser Elektronen in den Grundzustand ist durch die Aussendung von Licht begleitet, was als Lumineszenz bezeichnet wird.

In dieser Arbeit wurde Meerrettich-Peroxidase als enzymatische Markierung verwendet, die im alkalischen Milieu die Oxidation von Luminol katalysiert, welches die Lumineszenz erzeugt. Durch die Zugabe von chemischen Verstärkern, wie z.B. Phenolen, kann diese Reaktion noch verstärkt werden.

Die überschüssige Detektionslösung wurde entfernt und der Blot mittels Auflegen eines Röntgenfilms in einer Röntgenkassette detektiert. Danach wurde der Film der Kassette entnommen und für einige Minuten in Entwicklerlösung bis zur optimalen Darstellung der markierten Banden inkubiert. Daran schloss sich ein Waschschrift mit Aqua dest. an und darauf folgte die Inkubation in der Fixierlösung. Nach einem weiteren Waschschrift mit Aqua dest. wurde der Film bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.6 Entparaffinieren von humanen Retinaschnitten

Zunächst wurden mittels eines Durchlichtmikroskops geeignete Schnitte des humanen retinalen Gewebes ausgewählt. Die Objektträger mit den Schnitten wurden 2X jeweils für 5 Min in Xylol getaucht. Daran schlossen sich Bäder der Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe bestehend aus 99% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol und 50% Ethanol sowie ein Bad in ddH₂O für jeweils 3 Min an. Danach wurden die Objektträger auf der Heizplatte bei 37 °C getrocknet und die Position der Schnitte mit einem Pap-Pen markiert.

2.3.7 Immunhistochemische Färbungen

Für die indirekte Methode der Immunfluoreszenz wurden verschiedene Primärantikörper verwendet, mit denen man in Gewebeschnitten und Zellmonolayern bestimmte Proteine und deren Verteilung identifizieren und lokalisieren konnte. Grundlage hierfür ist die Erkennung von Antigenen durch einen spezifischen Antikörper. Der mikroskopische Nachweis erfolgt jedoch über einen Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist. Die Tatsache, dass mehrere Zweitantikörper an einen Erstantikörper binden können, führt zu einer Verstärkung des Signals.

Für immunhistochemische Färbungen können mono- und polyklonale Antikörper eingesetzt werden. Diese unterscheiden sich in der Herstellung. Monoklonale Antikörper werden nur von einem B-Zellklon gebildet. Diese Zellen bilden nur eine Art von Antikörper. Die Antikörper haben die gleiche Antigenerkennungsstelle und binden daher nur ein einziges Epitop eines Proteins. Polyklonale Antikörper enthalten dagegen immer eine Mischung von verschiedenen Antikörpern, d.h. sie werden von verschiedenen B-Zellklonen gebildet. Diese Art von Antikörper wird durch Verabreichung des Antigens an ein Versuchstier (z.B. Kaninchen, Schaf,

Ziege, Esel, Huhn) gebildet. Das aus dem Blut oder Eidotter dieser Tiere gewonnene Antiserum enthält eine Mischung von Antikörpermolekülen, die sich in ihren Eigenschaften z.B. Affinität der Bindung, Spezifität der Antigenerkennung und der erkannten Epitope unterscheiden.

Für Färbungen mit nur einem Antikörper wurde folgendes Protokoll angewendet:

Auf die, wie in 2.3.6 beschrieben, behandelten Objektträger wurden 100 µl Antikörperlösung mit den optimierten Antiserum-Konzentrationen (siehe Tabelle 21) pipettiert. Die Inkubation wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

Tabelle 21: Versuchsbedingungen für die eingesetzten Primärantikörper

Antikörper	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
Bestrophin (BEST1-N204-220)	pk	Huhn	1:100
Bestrophin (C-14)	pk	Ziege	1:100
Bestrophin (E6-6)	mk	Maus	1:500
E-Cadherin	pk	Kaninchen	1:400
Myc-Tag	pk	Kaninchen	1:100
His-Tag–FITC-gekoppelt	pk	Ziege	1:200

pk: polyklonal; mk: monoklonal.

Zur Minimierung unspezifischer Bindungsstellen und dadurch Minimierung der Hintergrundfluoreszenz wurden die Primär- und Sekundärantikörperlösungen mit 3% BSA versetzt. Des Weiteren wurde Triton X-100 zugegeben, welches als Detergenz die Membran perforiert. So wurde das Eindringen des Antikörpers in das Zellinnere gewährleistet. Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgten drei Waschschrte mit 1 x PBS für jeweils 10 Min auf dem Taumelschüttler. Danach wurde die Sekundärantikörperlösung für 1 h auf die Präparate gegeben. Welcher Sekundärantikörper verwendet wurde, hing von dem eingesetzten Primärantikörper ab (siehe Tabelle 21). Alle im Rahmen dieses Projektes für die Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 8) wurden in einer Verdünnung von 1:400 angewandt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, um ein Ausbleichen des konjugierten Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Danach folgten zwei weitere Waschschrte mit 1x PBS für jeweils 10 Min auf dem Taumelschüttler. Im Anschluss erfolgte die Anfärbung der DNA im Zellkern mittels DAPI (Konz. 0,1 µg/ml) bzw. TOPRO-3 (1:2000) für 10 Min und ein weiterer Waschschrte mit 1 X PBS für 5 Min. DAPI und TOPRO-3 sind DNA-bindende Fluorochrome. DAPI bildet mit den AT-reichen Bereichen der kleinen Furche der DNA einen fluoreszierenden Komplex. TOPRO-3 zeigt ebenfalls eine hoch affine Bindung an doppelsträngige DNA-Moleküle.

Nach der Kernfärbung wurden die Objektträger auf der Heizplatte getrocknet und mit DAKO Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt. Dieses spezielle Medium verstärkt die Visualisierung der Proben bei Betrachtung und verzögert das Photobleaching des Fluorochroms. Danach wurden die Objektträger bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert. Mit den auf Inserts kultivierten Zellen wurde genauso verfahren, nur, dass hier die Entparaffinierung und die Trocknungsschritte entfielen.

Doppelfärbungen bei denen ein mono- und ein polyklonaler Antikörper zum Einsatz kamen, wurden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, wobei die beiden Primärantikörper in der jeweiligen spezifischen Verdünnung gleichzeitig auf die Schnitte gegeben wurden. Bei Doppelfärbungen mit zwei polyklonalen Antikörpern mussten die Färbungen nacheinander durchgeführt werden, wobei der qualitativ schlechtere Antikörper zuerst zum Einsatz kam.

2.3.7.1 Dokumentation des immunhistochemischen Proteinnachweises mit Epifluoreszenz

Für die histologischen Studien an humanen retinalen Gewebepräparaten wurden in der vorliegenden Arbeit Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Das Phänomen der Fluoreszenz beruht auf der Emission von Licht. Dieses kommt durch die Anregung des delokalisierten Elektronensystems eines aromatischen Fluorochroms durch Photonen zustande. Dabei wird das Elektron eines Orbitals auf ein energetisch höheres Energieniveau gehoben. Das zweite Elektron, wenn vorhanden, bleibt in seinem Orbital. Die Rückkehr des angeregten Elektrons in das niedrigere Energieniveau kann unter Emission eines Photons erfolgen. Der Vorgang unterliegt dem Stoke'schen Gesetz, welches besagt, dass die Spektrerverschiebung auf Vibration beruht, die mit einem Energieverlust während des Absinkens des Elektrons von dem energetisch höheren Niveau auf das niedrigere Niveau einhergeht. Die Emission ist unter anderem von der chemischen Struktur des Fluorochroms und seines Lösungsmittels abhängig.

Bei der Dokumentation der Proben mit dem Keyence Biozero Epifluoreszenzmikroskop wird die Probe durch das Objektiv beleuchtet. Als Lichtquelle dient hier eine Quecksilberdampf Lampe, die das, in diesem Fall anregende UV-Licht, sichtbares Licht und Infrarotlicht emittiert. Die Anregungswellenlänge für ein bestimmtes Fluorochrom wird durch die Verwendung des entsprechenden Filters gewählt. Das Licht passiert den Filter und wird von dem Objektiv auf die Probe fokussiert. Das emittierte Licht passiert den Emissionsfilter, der das Licht im Bereich des Emissionsspektrums des Fluorochroms weiterleitet. Der dichromatische Strahlenteiler zwischen Anregungsfilter und Probe reflektiert kurzwelliges Anregungslicht auf die Probe. Das langwelligere Licht, welches die Probe aussendet, passiert den Strahlenteiler fast vollständig und erreicht den Emissionsfilter. Dies ist nötig um den dunklen

Hintergrund zu erhalten, vor dem sich das Fluoreszenzsignal leicht detektieren lässt. Mittels Epifluoreszenz lässt sich überprüfen, ob eine immunhistochemische Färbung erfolgreich durchgeführt wurde. Eine genaue Lokalisation eines Proteins ist jedoch nicht möglich, da die Probe nur eindimensional abgetastet werden kann und keine optischen Ebenen in der zu untersuchenden Probe dargestellt werden können.

2.3.7.2 Dokumentation des immunhistochemischen Proteinnachweises mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Je nach Absorptionsmaximum des verwendeten Fluorochroms wird ein Helium-Neon oder ein Argon-Krypton-Laser verwendet. In diesem Falle kam nur der Argon-Krypton-Laser zum Einsatz. Dieser erzeugt Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm bis 680 nm mit dem die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Die Festlegung des Scanbereiches erfolgt über die Einstellung des Scankopfes, wodurch die Proben zweidimensional in verschiedenen Ebenen abgetastet werden. Das emittierte Licht wird über Prismen zur Detektionslochblende (Pinhole) geleitet. Durch vergrößern oder verkleinern des Pinholes wird die Ebene des in die Photomultiplier einfallenden Lichts definiert. Licht aus anderen Ebenen wird nicht in die Photomultiplier weitergeleitet. Diese sind an Spannungsmesser angeschlossen und die Spannungsänderungen werden mit Hilfe der geräteeigenen Software (Olympus, FV 10-ASW viewer Version 4.2b) zu digitalen dreidimensionalen Bildern verarbeitet.

Bei der Darstellung der konfokalen Bilder können die Farben über die Software frei gewählt werden. Die Bilder wurden im Format 1024 X 1024 Pixel mit einem 60 X Ölimmersionsobjektiv gewonnen. Die abschließende Bearbeitung aller Bilder erfolgte mit der Software Image J, einer Software, die von den National Institutes of Health entwickelt wurde (<https://imagej.nih.gov/ij/>- ImageJ- An open platform for scientific image analysis.)

2.3.7.3 Kolokalisationsanalyse nach Pearson

Zunächst wurden die Bilder in ihre einzelnen Farbkanäle zerlegt und der rote und grüne Kanal in schwarz-weiß-Aufnahmen umgewandelt. Die Software misst und vergleicht die Pixelzahl in demselben definierten Bildausschnitt in den einzelnen Kanälen und korreliert die Werte. Der daraus resultierende Pearson-Koeffizient kann einen Wert zwischen -1 und +1 annehmen, wobei -1 keine Kolokalisation und +1 vollständige Kolokalisation bedeutet. Der resultierende Wert stellt jedoch keinen prozentualen Anteil dar, sondern einen Wert für die Korrelation der Pixel. Außerdem können mit dieser Methode keine Aussagen über die Pixelintensitäten getroffen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung des *hBEST1*-Gens

3.1.1 Amplifikation des *hBEST1*-Gen-Transkriptes

Zunächst wurde eine two step-Reverse-Transkriptase-PCR durchgeführt. Ausgangsmaterial stellte die RNA einer humanen Gewebeprobe des retinalen Pigmentepithels (RPE) dar. Mittels des sequenzspezifischen Primers #232-VMD211b und der Reversen Transkriptase wurde, wie in 2.2.3 beschrieben, die komplementäre DNA (cDNA) des entsprechenden RNA-Fragmentes in der Reverse Transkriptase-Reaktion gewonnen.

Die so gewonnene cDNA wurde im Anschluss in den Reaktionsansatz für eine Polymerase-Kettenreaktion nach dem in 2.2.4.1 beschriebenen Protokoll eingesetzt. 5 µl des entstandenen PCR-Produktes wurden in einem 1%igen Agarosegel nach dem in 2.2.12.3 beschriebenen Protokoll aufgetrennt. Die berechnete Länge des *hBEST1* PCR-Produktes betrug 1765 bp. Um das PCR-Produkt in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor klonieren zu können, musste noch ein 3'-Adenosin-Überhang nach dem in 2.2.5 beschriebenen Protokoll an das PCR-Produkt angefügt werden.

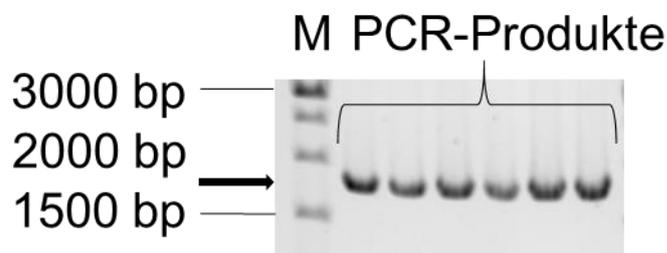


Abbildung 3-1: Agarose-Gelelektrophorese des RT-PCR-Produktes *hBEST1*.

Das *hBEST1*-PCR-Produkt besitzt eine Größe von 1765 bp (schwarzer Pfeil). Durch die Agarose-Gelelektrophorese konnte die korrekte Amplifikation des *hBEST1*-PCR-Produktes gezeigt werden. M: 1 kb DNA-Größenmarker.

3.1.2 TOPO-TA-Klonierung des *hBEST1*-Gens

Im nächsten Schritt wurde das PCR-Produkt in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-TA-Vektor kloniert. Dies erfolgte nach dem in 2.2.6 beschriebenen Protokoll. Es wurden 1,5 µl des PCR-Produktes für die Reaktion eingesetzt. Im Anschluss an die Klonierung erfolgte die Transformation nach dem in Kapitel 2.3.1.4 beschriebenen Protokoll. Nachdem die Klone, wie in 2.3.1.5 beschrieben, isoliert wurden, wurde die Plasmid-DNA mittels einer Mini-Präparation (2.2.1.2.1) isoliert.

Daraufhin wurde mit der *pT-hBEST1*-Plasmid-DNA ein Restriktionsendonukleaseverdau nach dem in 2.2.9 beschriebenen Protokoll mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* durchgeführt. Dabei wurde das *hBEST1*-Insert aus dem Vektor ausgeschnitten und in einem 1%igen Agarosegel (siehe 2.2.12.3) aufgetrennt.

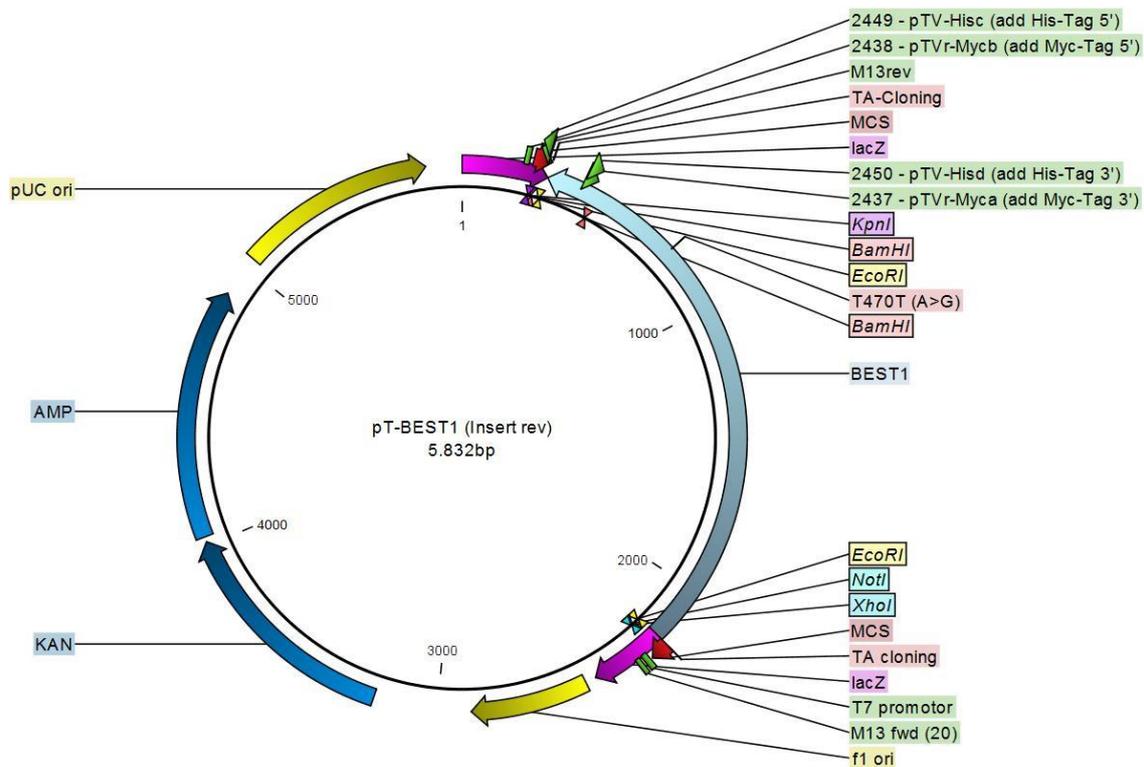


Abbildung 3-2: Vektorkarte des pT-BEST1-Vektors.

BEST1: kodierendes *hBEST1*-Insert (in umgekehrter Leserichtung einkloniert) mit T470T (A>G): Polymorphismus; BamHI, EcoRI, KpnI, NotI, XhoI: Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen; MCS: Multicloning site, TA-Cloning: TA-Klonierungsstelle; M13rev und M13 forward (20): Sequenzierprimerbindestellen; 2437-pTV..., 2438-pTV..., 2449-pTV..., 2450-pTV...: Mutageneseprimerbindestellen; LacZ: LacZ-Gen zur Identifikation positiver Klone (hier durch das Insert geteilt); AMP/KAN: Antibiotikaresistenzgene; f1 und pUC origin: Replikationsstartpunkte.

Die Plasmid-DNA der Klone 6, 9, 11 und 13 wurde zwecks Überprüfung des Inserts mit dem Primer #0330 VMD210/2b sequenziert (2.2.11). Klon 13 wurde für die Sequenzierung ausgewählt, da die Bande auf der Höhe von ca. 2000 bp deutlich prominenter war und das Insert charakterisiert werden sollte. Die übrigen Klone wurden ausgewählt, da sie unterschiedliche Varianten darstellen, die im Gel sichtbar waren. Die fehlerfreie Integration des Inserts in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor konnte bei den Klonen 6, 9 und 11 nachgewiesen werden. Das Insert war bei diesen Klonen gegen die Leserichtung einkloniert. Von den Klonen wurden Glycerolstocks (2.3.1.6) angelegt.

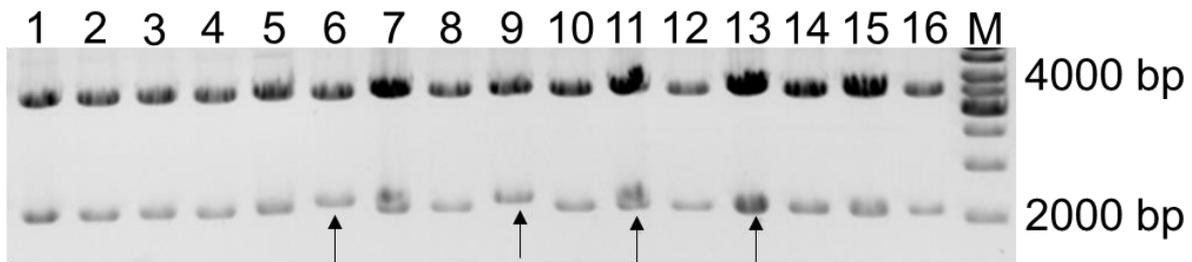


Abbildung 3-3: Verifikation isolierter pT-BEST1-Vektor-Klone mit der Restriktionsendonuklease EcoRI.

1 - 16: Restriktionsendonukleaseverdau der Klone; Durch den Restriktionsendonukleaseverdau entstanden bei den korrekt klonierten Plasmiden zwei Fragmente in der Größe von 3912 bp und 1920 bp. Die mit einem schwarzen Pfeil markierten Klone wurden sequenziert. M: 1 kb DNA-Größenmarker.

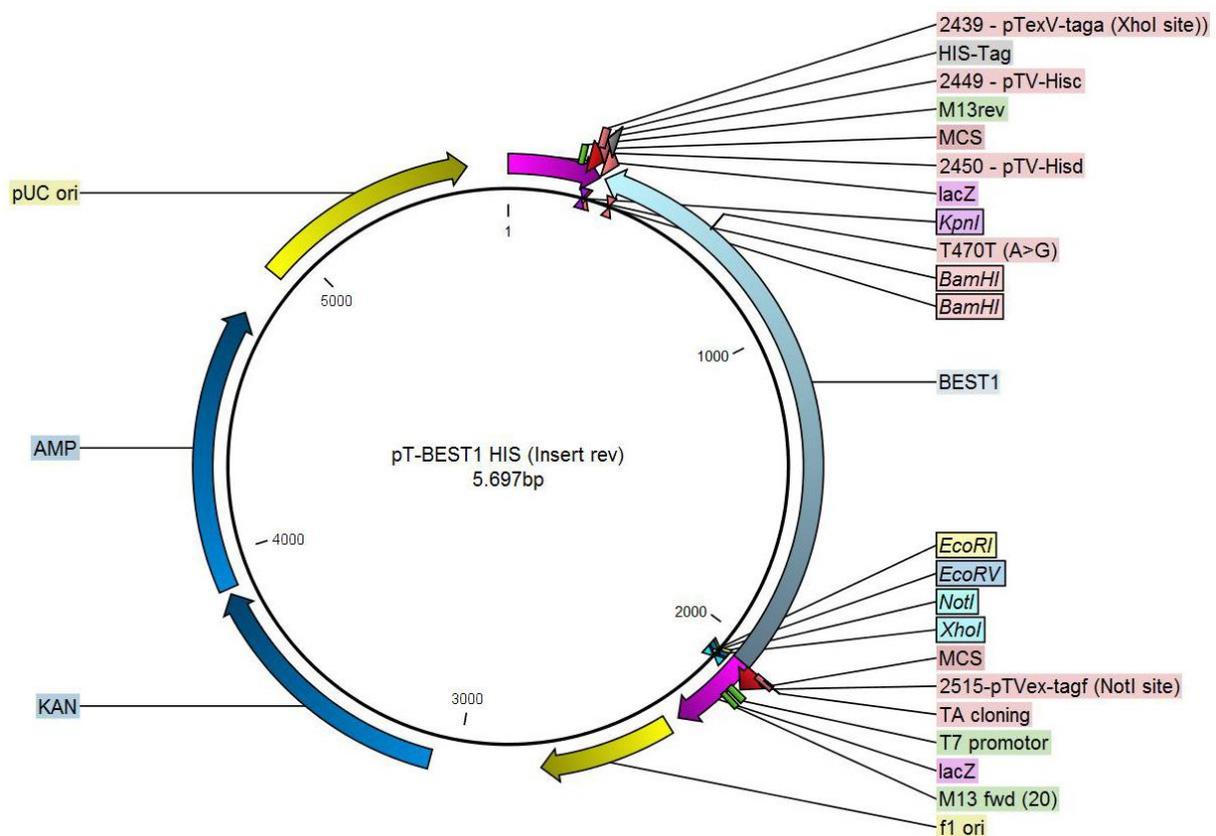


Abbildung 3-4: Vektorkarte des pT-BEST1 His (Insert rev)-Plasmids.

BEST1: kodierendes hBEST1-Insert (in umgekehrter Leserichtung einkloniert) mit T470T (A>G): Polymorphismus; His-Tag: His-Tag Markierung, pBR322_origin, f1_origin: Replikationsstartpunkte; AMP und KAN: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin und Kanamycin); T7_promotor: Promotor; BamHI, EcoRI, EcoRV, KpnI, NotI, XhoI: Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen; 2439-pTexV-taga, 2449-pTV-Hisc, 2450-pTV-Hisd, 2515-pTVex-tagf: Primerbindestellen.

Mit Abschluss der erfolgreichen Herstellung des pT-BEST1-Plasmids lag das *hBEST1*-Geninsert aufgereinigt und in großer Menge für die weitere Umklonierung in einen Expressionsvektor, der in Säugerzellen exprimiert werden konnte, vor. Zur Umklonierung wurde die Plasmid-DNA zunächst mit dem Primerpaar #2449 / #2450 in eine long range PCR

(2.2.4.3) eingesetzt, um einen His-Tag anzufügen (Abbildung 3-4). Im Anschluss daran wurde eine Ligation nach dem in Kapitel 2.2.8 beschriebenen Protokoll mit dem PCR-Produkt durchgeführt. Daran schloss sich eine, wie in 2.3.1.4 beschriebene, Transformation und eine, wie in 2.3.1.5 beschriebene, Isolation der selektierten Klone an. Das Plasmid wurde im Anschluss mit dem M13 fwd (20)-Primer direkt sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte das erwartete Konstrukt. Von den Klonen wurden Glycerolstocks (2.3.1.6) angelegt.

3.1.3 Klonierung des *hBEST1*-Gens in den pCDNA3.1(+) Vektor

Die Plasmid-DNA pT-BEST1-His wurde im Anschluss über eine Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.2.2) isoliert und aufgereinigt.

Für die Umklonierung wurde eine Long-Range-PCR (2.2.4.1) mit dem Primerpaar #2439/#2515 angeschlossen, um das Insert aus dem pT-BEST1 His (Insert rev)-Plasmid zu isolieren und geeignete Restriktionsendonukleaseschnittstellen für die Klonierung einzufügen. Nach Prüfung des Amplifikats in einer Agarosegelelektrophorese (2.2.12.3) wurde das PCR-Produkt einem Restriktionsendonukleaseverdau (2.2.9) mit NotI und XhoI unterzogen, in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mittels Säulenaufreinigung aus dem Gel eluiert (2.2.1.3.2). Der Expressionsvektor pCDNA 3.1(+) wurde mit den gleichen Enzymen wie das Insert verdaut und zusätzlich dephosphoryliert (2.2.7), um eine Religation zu vermeiden. Das Insert wurde im Verhältnis 1:2 (Vektor/Insert) in den pCDNA3.1(+)-Vektor ligiert (2.2.8). Nach der Ligation erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA (2.3.1.4). Sechs der auf der Agarplatte gewachsenen Klone wurden selektiert, angezüchtet (2.3.1.1) und die Plasmid-DNA über eine Mini-Präparation isoliert (2.2.1.2.1). Die Plasmid-DNA der Klone wurde mit der Restriktionsendonuklease HincII verdaut (2.2.9), welche vier Schnittstellen in der Plasmid-DNA besitzt. Drei der Schnittstellen lagen im Vektor und die vierte im Insert. Es sollten also vier Fragmente mit jeweils 3118 bp, 2185 bp, 1663 bp und 234 bp Länge entstehen (Abbildung 3-5).

Bei allen der isolierten Klone konnten Restriktionsfragmente in den gesuchten Größen nachgewiesen werden (Abbildung 3-6). Es wurden die Plasmide der Klone 2 und 3 sequenziert (2.2.11), da dort der Verdau die beste DNA-Qualität vermuten ließ. Die Sequenzierergebnisse wurden mit der erwarteten Plasmidsequenz verglichen und von den Klonen, die die gewünschte Plasmid-DNA enthielten wurden Glycerolstocks angelegt (2.3.1.6). Mit einem der Klone wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation (2.2.1.2.2) durchgeführt, um ausreichende Mengen kontaminationsfreier und salzarmer DNA für die anschließenden Transfektions-Experimente zu erhalten.

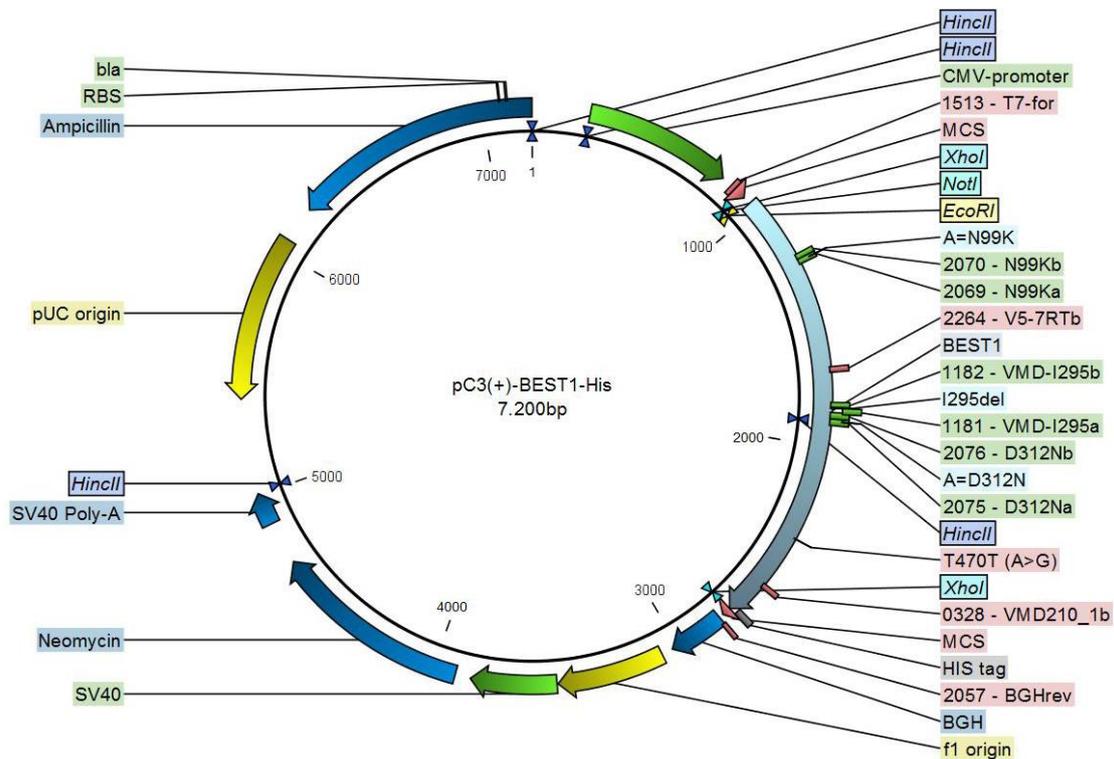


Abbildung 3-5: Vektorkarte des pC3(+)-BEST1-His-Vektors.

BEST1: kodierendes hBEST1-Insert mit T470T (A>G): Polymorphismus; EcoRI, HincII, NotI und XhoI: Restriktionsschnittstellen; BGH und SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignale; f1 origin und pUC origin: Replikationsstartpunkte; Neomycin und Ampicillin: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin und Neomycin); bla, CMV-promotor und SV40: Promotoren. 0328-VMD210_1b, 1513-T7-for, 2057-BGHrev, 2264-V5-7RTb: Sequenzierprimer. p.N99K, p.D312N und p.I295del: Mutationen in den mutierten Versionen des Vektors; 1181-VMD-I295a, 1182-VMD-I295b. 2069-N99Ka, 2070-N99Kb, 2075-D312Na, 2076-D312Nb: Mutageneseprimer, His-Tag: His-Tag-Markierung

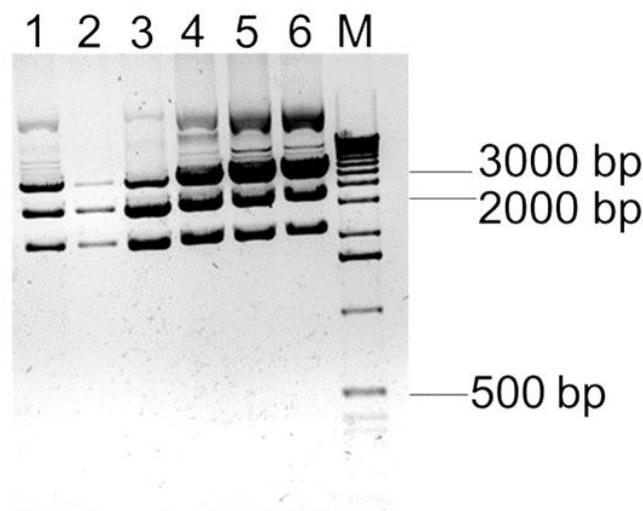


Abbildung 3-6: Verifikation isolierter pC3(+)-BEST1-His-Vektor-Klone mit der Restriktionsendonuklease HincII.

(1-6): Restriktionsendonukleaseverdau der Plasmide der Klone 1-6. Durch den Restriktionsendonukleaseverdau entstanden bei den korrekt klonierten Plasmiden vier Fragmente mit den Größen 3118 bp, 2185 bp, 1694 und 243 bp. Die Bande bei 234 bp ist auf der Abbildung nicht zu erkennen, da das Fragment so klein ist, dass im Vergleich zu equimolaren Mengen der größeren Fragmente zu wenig Farbstoff bindet, um dargestellt werden zu können. M: 1 kb DNA-Größenmarker.

3.1.4 Einführen der Mutationen in das pC3(+)-hBEST1-His-Plasmid

Die Mutagenese-PCR erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.4.3 beschriebenen Protokoll. Die Missense-Mutationen p.D312N und p.N99K sowie die *in frame* Deletionsmutante p.I295del wurden mit den speziell designten, spezifischen Primerpaaren #2075-V-D312Na und #2076 V-D312Nb, #2069-V-N99Ka und #20701-V-N99Kb und #1181-VMDI295a und #1182-VMDI295b in das *hBEST1*-Insert eingefügt. Die Mutagenese-PCR (2.2.4.3) wurde mit der durch eine Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.2.2) aufgereinigten Plasmid-DNA des pC3(+)-BEST1-His-Vektors durchgeführt. Es wurden 20 ng Plasmid-DNA in den Reaktionsansatz eingesetzt. Nach der Mutagenese-PCR lag die mutierte Plasmid-DNA linear und mit stumpfen 5'-phosphorylierten Enden vor. Das Mutagenese-PCR-Produkt wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.12.3), wobei jeder PCR-Ansatz auf zwei Geltaschen verteilt wurde. Die erwartete Größe der linearen Plasmid-DNA betrug 7200 bp.

Die gewünschten Banden (siehe Abbildung 3-7) wurden mittels einer Stanze aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt (2.2.1.3.2) und photometrisch quantifiziert (2.2.10.1).



Abbildung 3-7: Agarose-Gelelektrophorese der Mutagenese-PCR-Produkte der Plasmid-DNA pC3(+)-BEST1-D312N-His, pC3(+)-BEST1-N99K-His und pC3(+)-BEST1-I295del-His.

Es wurden je zwei Geltaschen pro PCR-Produkt beladen. M: 1 kb DNA-Größenmarker.

Anschließend wurde eine Ligation der 5'-phosphorylierten Enden nach dem in 2.2.8 beschriebenen Protokoll durchgeführt, um die linear vorliegende Plasmid-DNA wieder zu einem ringförmigen DNA-Molekül zu schließen. In Abbildung 3-5 ist die Vektorkarte der ligierten zirkulären Plasmid-DNA mit den mutierten Positionen gezeigt.

Die zirkuläre DNA wurde in elektrokompetente XL1Blue E.coli transformiert (2.3.1.4) und auf einer mit Ampicillin versetzten LB-Agarplatte (2.3.1.2) ausgestrichen. Sechs der Klone, die auf der Platte gewachsen waren, wurden selektiert (2.3.1.5), deren Plasmid-DNA mittels einer Mini-Präparation (2.2.1.2.1) isoliert und über einen Restriktionsendonukleaseverdau (2.2.9) mit der Restriktionsendonuklease HincII überprüft. Erwartungsgemäß entstanden durch den Verdau vier Fragmente in der Größe von 3118 bp, 2185 bp, 1663 bp und 234 bp. Zur Verifizierung der Mutationen wurde eine Sequenzierung (2.2.11) durchgeführt. Von den Klonen, die die jeweilige Mutation trugen wurden Glycerolstocks angelegt (2.3.1.6). Außerdem

wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt (2.2.1.2.2), um für die weiteren Experimente ausreichende Mengen an salzreicher und kontaminationsfreier DNA zu erhalten.

3.1.5 Klonierung des *hBEST1*-Gens in den pCDNA™5/FRT-Vektor

Da im Rahmen dieses Projektes eine Zelllinie benötigt wurde, die den *hBEST1* Wildtyp zusammen mit einem Myc-Tag stabil exprimieren sollte, wurde das *hBEST1*-Insert in den pCDNA5(+)-FRT-Vektor kloniert. Dafür wurde das Wildtyp-pT-BEST1-(Insert rev)-Plasmid mit den Mutagenese-Primern #2437 und #2438 in einer long range-PCR (2.2.4.3) amplifiziert, um einen Myc-Tag anzufügen. Danach wurden das PCR-Produkt und der pCDNA™5/FRT-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *XhoI* verdaut (2.2.9) und eine Ligation durchgeführt (siehe 2.2.8), um die linearisierte Plasmid-DNA wieder zu einem Ring zu schließen. Das ligierte, zirkuläre Konstrukt pC5-BEST1-Myc-FRT ist in Abbildung 3-8 zu sehen.

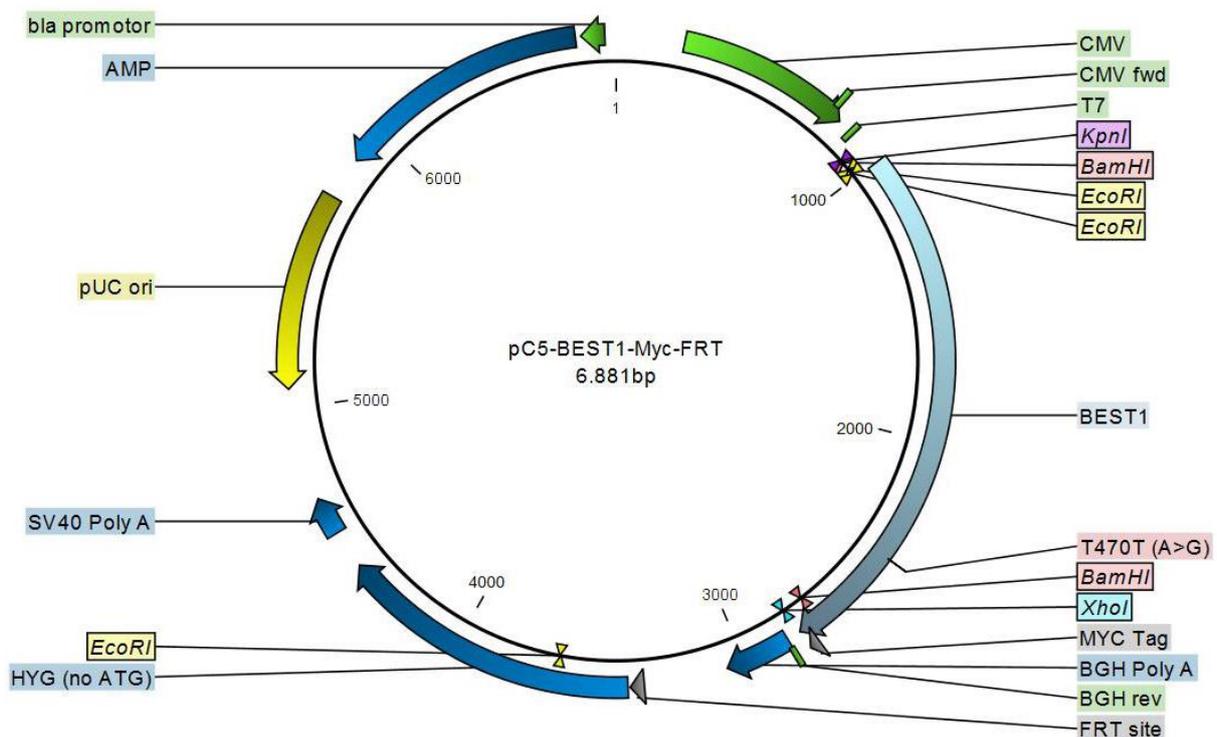


Abbildung 3-8: Vektorkarte des pC5-BEST1-Myc-FRT-Vektors.

BEST1: kodierendes *hBEST1*-Insert mit T470T (A>G): Polymorphismus; *BamHI*, *EcoRI*, *KpnI*, *NotI* und *XhoI*: Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen; BGH und SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignale; pUC origin: Replikationsstartpunkte; HYG und AMP: Antibiotikaresistenzgene (Hygromycin und Ampicillin); bla-promotor, T7 und CMV: Promotoren. Myc-Tag: Myc-Tag-Markierung; CMV fwd und BGH rev: Sequenzierprimer pUC ori: Replikationsstartstelle; FRT site: FLP Recombination Target für die Integration des Vektors in das Genom der Flip-In host Zelllinie.

Danach wurde das Vektorkonstrukt transformiert (siehe 2.3.1.4) und gemäß Kapitel 2.3.1.5 weiterverfahren. Im Anschluss erfolgte eine Plasmid-Minipräparation (2.2.1.2.1) mit anschließendem Restriktionsendonukleaseverdau (2.2.9) von sechs Klonen mit der Restriktionsendonuklease BamHI (Abbildung 3-9).

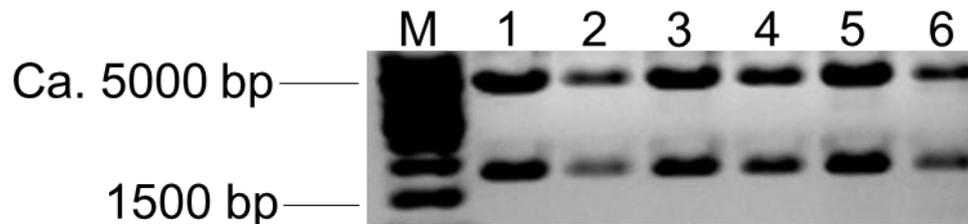


Abbildung 3-9: Verifikation der isolierten pC5-BEST1-Myc-FRT-Vektor-Klone mit der Restriktionsendonuklease BamHI.

1 - 6: Restriktionsendonukleaseverdau der Klone. Der Verdau zeigt die erwarteten Banden auf der Höhe von 1783 bp für die Wildtyp-DNA und bei 5098 bp für den Vektor. M: 1 kb DNA-Größenmarker.

Die Klone, bei denen das Insert die richtige Orientierung hatte, wurden zum Sequenzieren verschickt (siehe 2.2.11). Von den Klonen, bei denen der Einbau und die Sequenz des Inserts erwartungsgemäß waren, wurden Glycerolstocks (2.3.1.6) angelegt. Außerdem wurde eine Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.2.2) durchgeführt, um eine ausreichende Menge an salzreicher und kontaminationsfreier DNA für die sich anschließende stabile Transfektion zu erhalten.

3.2 Charakterisierung eines N-terminalen anti-Bestrophin 1-Antikörpers

Da sämtliche verfügbaren spezifischen Antikörper gegen Bestrophin 1 gegen Epitope im C-Terminus des Proteins gerichtet sind, wurde ein Antikörper konzipiert, der ein Epitop im N-Terminus erkennt. Dies erschien im Hinblick auf einige wichtige Bindestellen und funktionelle Einheiten des Proteins im C-Terminus sinnvoll. Zu nennen sind hier die Calciumbindemotive, sowie als funktionelle Einheiten das Interaktionszentrum mit der β_4 -Untereinheit (UE) des spannungsabhängigen Calciumkanals $Ca_v1.3$ und das Interaktionszentrum mit der Proteinphosphatase 2. Des Weiteren sollte eine Beeinträchtigung der möglichen Oligomerisierung der mutierten mit den nicht mutierten Bestrophinuntereinheiten so vermieden werden. Darüber hinaus ist ein N-terminaler Antikörper universell auch in Mausmodellen einsetzbar.

Dafür wurde zunächst ein Alignment mit den vier bekannten humanen Bestrophin-Isoformen durchgeführt. Als Antigen wurde ein Oligopeptid entsprechend der Aminosäuren (AS) 204-220 zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne (TMD) ausgewählt. In diesem Bereich

befinden sich keine porenbildenden, geladenen oder in Interaktionen involvierte AS (für die Peptidsequenz siehe 2.3.3). Das entsprechende Oligopeptid wurde von einem kommerziellen Anbieter (Davids, Regensburg) synthetisiert und eine Legehennen damit immunisiert. Der Antikörper wurde aus dem Eidotter aufgereinigt geliefert. Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurden verschiedene Experimente im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen Bestrophin 1 durchgeführt. Zunächst wurden humane Retinaschnitte entparaffiniert (siehe 2.3.6) und mit einem kommerziell verfügbaren Antikörper (anti BEST1 C-14), sowie dem N-Terminalen Antikörper (BEST1-N204-220) angefärbt (2.3.7) und mittels Epifluoreszenz ausgewertet (2.3.7.1, Abbildung 3-10).

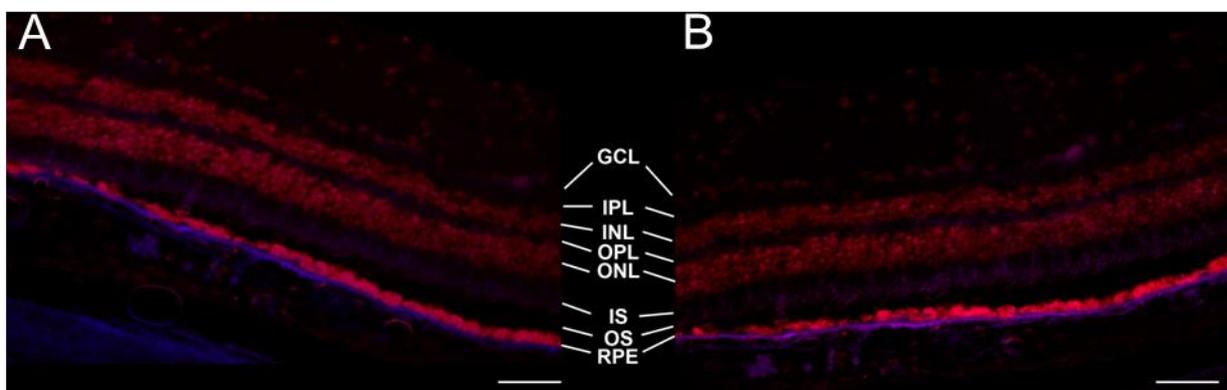


Abbildung 3-10: Nachweis der Bestrophin 1-Expression in der humanen Retina mit einem N- und einem C-terminalen Antikörper.

Nachweis von Bestrophin 1 in humanem retinalem Gewebe A) mit einem kommerziell erhältlichen C-terminalen Antikörper (anti BEST1 (C-14)) im Vergleich zu B), mit einem für diese Studie hergestellten BEST1-N204-220 Antikörper. Scale bar: 10 µm. RPE: Retinales Pigmentepithel; OS: Photorezeptoraussensegmente; IS: Photorezeptorinnensegmente; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht; blaue Fluoreszenz: Bestrophin 1; rote Fluoreszenz (TOPRO-3): Zellkerne.

Für die immunhistochemische Färbung des Bestrophin 1 wurden in diesem Falle Sekundärantikörper verwendet, die mit DyeLight 350 und AlexaFluor 350 (blaue Fluoreszenz) markiert waren. Dies war nötig, da in den humanen Retinaprobe in den RPE-Zellen umfangreiche Lipofuszinablagerungen vorlagen. Diese zeigten, wenn sie mit UV-Licht belichtet wurden, eine sehr starke Eigenfluoreszenz, die eine Detektion des Bestrophin 1 über einen Sekundärantikörper mit roter oder grüner Fluoreszenzmarkierung zu stark überstrahlte. Da die Anregungswellenlänge des blauen Fluoreszenzfarbstoffes außerhalb des Spektrums der Eigenfluoreszenz von Lipofuszin lag, wurde der Bestrophin 1-spezifische Antikörper über ein blaues Fluoreszenzsignal detektiert. Die Kernfärbung erfolgte mit TOPRO-3 in Rot, da sich die Zellkerne stark anfärbten und gut von der Fluoreszenz der Lipofuszinablagerungen zu

unterscheiden waren. Der stark rot fluoreszierende Streifen direkt unter dem RPE stellt die Eigenfluoreszenz des Lipofuzzins dar, während die schwächer rot leuchtenden Kerne die Strukturen der Retina wiedergeben (Abb. 3-10).

Des Weiteren wurde überprüft, ob sich der Antikörper zur Darstellung von transfizierten Zellen eignet. Es kam ein weiterer kommerziell erhältlicher Antikörper, der bereits für die Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert worden war, in der Verdünnung 1:2000 (Best anti Maus (E6-6)) für den direkten Vergleich zum Einsatz. Der BEST1-N204-220 wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Für den Test wurden die MDCK-II-Zellen zunächst nicht auf Filtereinsätzen ausgesät und polarisiert. Bedingt durch diese Tatsache und durch die großen Abstände zwischen den einzelnen Zellen sieht man, dass Bestrophin 1 (grüne Fluoreszenz) in beiden Fällen im Zytoplasma der Zellen verteilt vorlag. Die Zellkerne sind mit DAPI in blau dargestellt. Des Weiteren wurden transfizierte Zellen mit Bestrophin 1-Nachweis und nicht transfizierte Zellen ohne Bestrophin 1-Nachweis, bei denen nur der Kern in blau gefärbt ist, dargestellt (Abbildung 3-11).

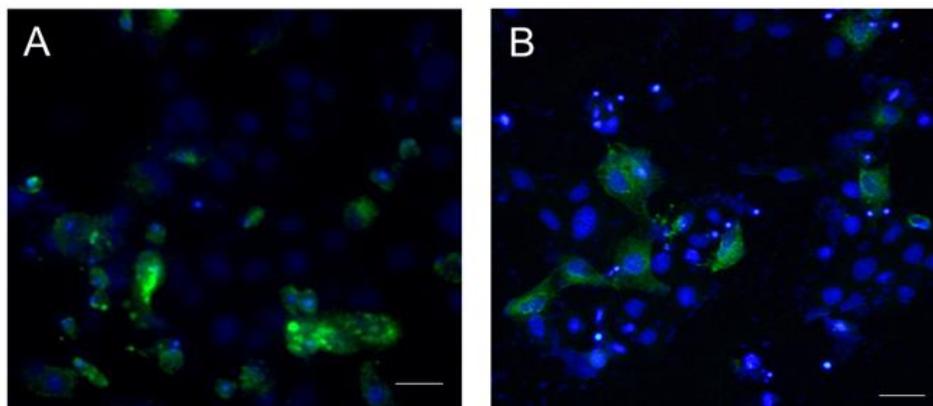


Abbildung 3-11: Immunfluoreszenz von Bestrophin 1 in transient transfizierten MDCK-II-Zellen.

Mit dem pC3(+)-BEST1-His-Plasmid transfizierte MDCK-II-Zellen wurden A) mit dem BEST1-N204-220 Antikörper (Davids) gegen Bestrophin 1 und B) mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper (anti BEST1 (E6-6)) gegen Bestrophin 1 gefärbt. Grüne Fluoreszenz: Bestrophin 1; blaue Fluoreszenz (DAPI): Zellkerne. Scale bar: 10 μ m.

Nachfolgend wurde der Antikörper im Western Blot-Experiment mit transient transfizierten HEK293T/17-Zellen getestet. In Abbildung 3-12A sieht man eine schwache Bande bei ca. 70 kDa und eine etwas prominentere knapp unter 100 kDa. Da uns der Antikörper aufgrund dieser Beobachtung zu unspezifisch erschien, wurde er im Weiteren nicht mehr für Western Blot-Experimente benutzt. In Abbildung 3-12B ist zum Vergleich ein Western Blot abgebildet,

der mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper anti BEST1 (C-14) gefärbt wurde (vgl. 3.4.2). Für die nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbungen kam der Antikörper jedoch zum Einsatz, da es sich bei der Immunfluoreszenzfärbung um eine weniger sensitive Methode als den Western Blot handelt. Außerdem konnte bereits an den humanen Retinaschnitten gezeigt werden, dass der Antikörper ein identisches Färbungsmuster mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern zeigt (vgl. Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11).

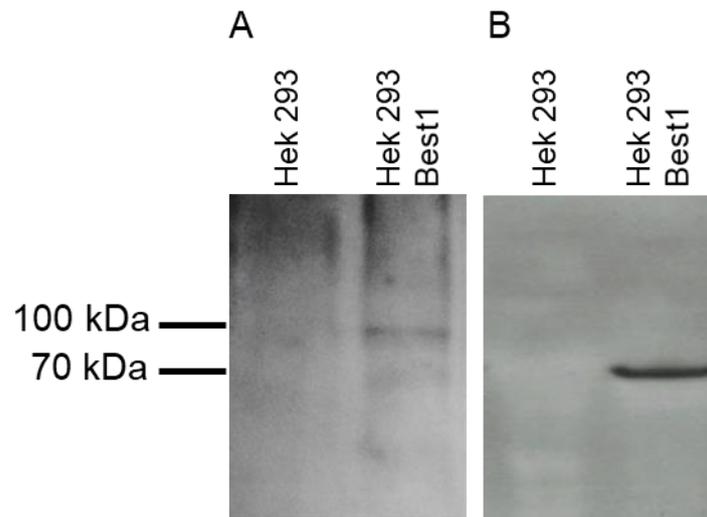


Abbildung 3-12: Western Blot-Experiment mit dem BEST1-N204-220 und dem Antikörper anti BEST1 (C-14).

In A) ist ganz links der Marker eingezeichnet. Der Blot zeigt in der linken Spur Protein aus nicht transfizierten HEK293T/17-Zellen als Negativkontrolle und rechts eine erwartete Bande bei ca. 70 kDa. Darüber ist eine prominentere unspezifische Bande bei ca. 90 kDa zu sehen. B) zeigt in der linken Spur nicht transfizierte HEK293T/17-Zellen als Negativkontrolle und in der rechten Spalte den spezifischen Nachweis von BEST1 mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper anti BEST1 (C-14).

3.3 Darstellung der intrazellulären Lokalisation von transient transfizierten *hBEST1*-Mutationen in der MDCK-II-Zelllinie

Die Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation wurden an der MDCK-II-Zelllinie durchgeführt, da die Zellen einschichtig wuchsen. Des Weiteren polarisierten sich die Zellen, wenn man sie auf Inserts kultivierte, d.h. die intrazelluläre Verteilung der Proteine erfolgte wie bei Epithelzellen, gerichtet von apikal nach basolateral, entsprechend der Funktion eines Abschlussgewebes. Die Filter stellten dabei einen Ersatz für die extrazelluläre Matrix dar.

Darüber hinaus exprimierten MDCK-II-Zellen kein endogenes Bestrophin 1 wie in Abbildung 3-13 gezeigt.

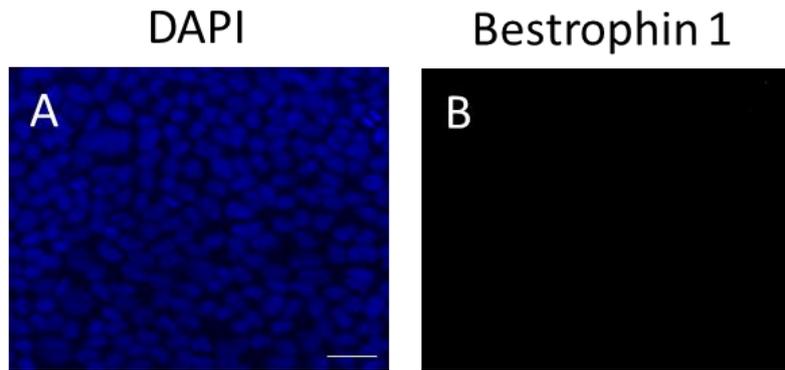


Abbildung 3-13: Endogene Expression von *hBEST1* in MDCK-II-Zellen.

A: DAPI-Färbung der Zellkerne (blaue Fluoreszenz). B: Nachweis der nicht vorhandenen endogenen Expression von hBEST1. Scale bar: 20 μ m.

Generell ist festzuhalten, dass die Effizienz der transienten Transfektion bei den MDCK-II-Zellen eingeschränkt war. Dies zeigte sich in der geringen Zahl der Zellen, die in einer Kontrolltransfektion mit pEGFP-N1 ein Fluoreszenzsignal als Zeichen einer erfolgreichen Transfektion zeigten (nicht dargestellt). Des Weiteren war zu beobachten, dass sich die meisten Transfektanten am Rand der Zellrasen befanden und dass die Transfektanten leicht abstarben und so Lücken im Zellrasen hinterließen, was einen toxischen Effekt auf die transfizierten Zellen vermuten ließ.

Zur besseren Orientierung innerhalb der Zellen wurde eine Immundoppelfärbung (2.3.7) gegen endogenes E-Cadherin mit dem Antikörper anti-E-Cadherin und gegen Bestrophin 1 mit dem Antikörper BEST1 N204-220 durchgeführt. Die Färbungen wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (siehe 2.3.7.2) ausgewertet.

E-Cadherin ist ein tight junction Protein, das nur exprimiert wird, wenn die Zellen untereinander in sehr engem Kontakt stehen und tight junctions ausbilden. Daher konnte diese Färbung auch als Kontrolle für den Bewuchs der Filter und die Überprüfung der Zelldichte herangezogen werden. In Abbildung 3-14A ist der Nachweis von E-Cadherin in Rot dargestellt. In Abbildung 3-14A ' ist der Bestrophin 1-Nachweis in grün gezeigt. Man kann auf dem Bild erkennen, dass Bestrophin 1, wenn die Zellen in engem Kontakt standen, zur Plasmamembran transportiert wurde (Abbildung 3-14A-A''). Wenn jedoch kein Zell-Zellkontakt bestand, blieb das Bestrophin 1 im Zytoplasma liegen (Abbildung 3-14a-a''). Allerdings ist auch erkennbar, dass nur wenige Zellen transfiziert wurden und einen immunochemischen Nachweis (grünes Fluoreszenzsignal) ermöglichten. Im Falle des Polymorphismus p.D312N sieht man, dass das Protein im Zytoplasma liegen blieb und nicht zur Plasmamembran transportiert wurde, selbst wenn ein enger Zell-Zellkontakt bestand (Abbildung 3-14B'-B'').

Betrachtet man die Mutation p.N99K sieht man, dass das Protein im Zytoplasma liegen blieb. Die granuläre Immunreaktion vermittelt den Eindruck, dass das Protein in vesikulären

Strukturen im Zytoplasma eingeschlossen war (Abbildung 3-14C'-C''). Im Falle der Mutation p.I295del sieht man, dass das Protein im Zytoplasma liegen blieb und nicht zur Plasmamembran transportiert wurde (Abbildung 3-14D-D''). Im Gegensatz zur Mutation p.N99K lag das Protein nicht in vesikulären Strukturen vor. Man sieht, dass das Protein, wie bei der Mutation p.D312N, um den Zellkern verteilt vorlag (Abbildung 3-14D'-D''). Wenn allerdings kein Zell-Zell-Kontakt bestand, blieb das Protein größtenteils im Zytoplasma liegen. Dass der dargestellte Bestrophinnachweis auf dem heterolog transfizierten

Bestrophin 1 beruht, zeigt sich daran, dass in allen Overlays transfizierte und nicht transfizierte Zellen erkennbar sind.

Des Weiteren wurde eine Kolokalisationsanalyse mit den gewählten Bildausschnitten durchgeführt (2.3.7.3). Da zumindest für das Wildtypprotein bekannt ist, dass es zur Plasmamembran transportiert wird, wurde für die Kolokalisationsanalyse das tight-junction Protein E-Cadherin gegengefärbt, welches ebenfalls an der Plasmamembran exprimiert ist. Dadurch konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Mutationen ebenfalls membranständig waren oder nicht. Die Zusammenfassung der Kolokalisationsanalyse ist in Tabelle 22 dargestellt. Für die Kolokalisationsanalyse wurde die Korrelation nach Pearson (2.3.7.3) angewendet.

Tabelle 22: Kolokalisationsanalyse des transient exprimierten Bestrophin 1 mit E-Cadherin in MDCK-II-Zellen.

Protein	Pearson's Koeffizient
BEST1-Wildtyp-His	0,84 ±,008
BEST1-D312N-His	0,64 ±0,004
BEST1-N99K-His	Keine positive Korrelation gefunden
BEST1-I295del-His	Keine positive Korrelation gefunden

Das Wildtypprotein zeigt mit dem E-Cadherin mit einem Koeffizienten von 0,84 eine nahezu vollständige Kolokalisation. Der Polymorphismus p.D312N-His zeigt zusammen mit dem E-Cadherin mit dem Koeffizienten von 0,64 auch eine recht hohe Kolokalisation. Bei den beiden Mutationen p.N99K-His und p.I295del-His konnte allerdings keine Kolokalisation detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die Proteine nicht zur Plasmamembran transportiert werden.

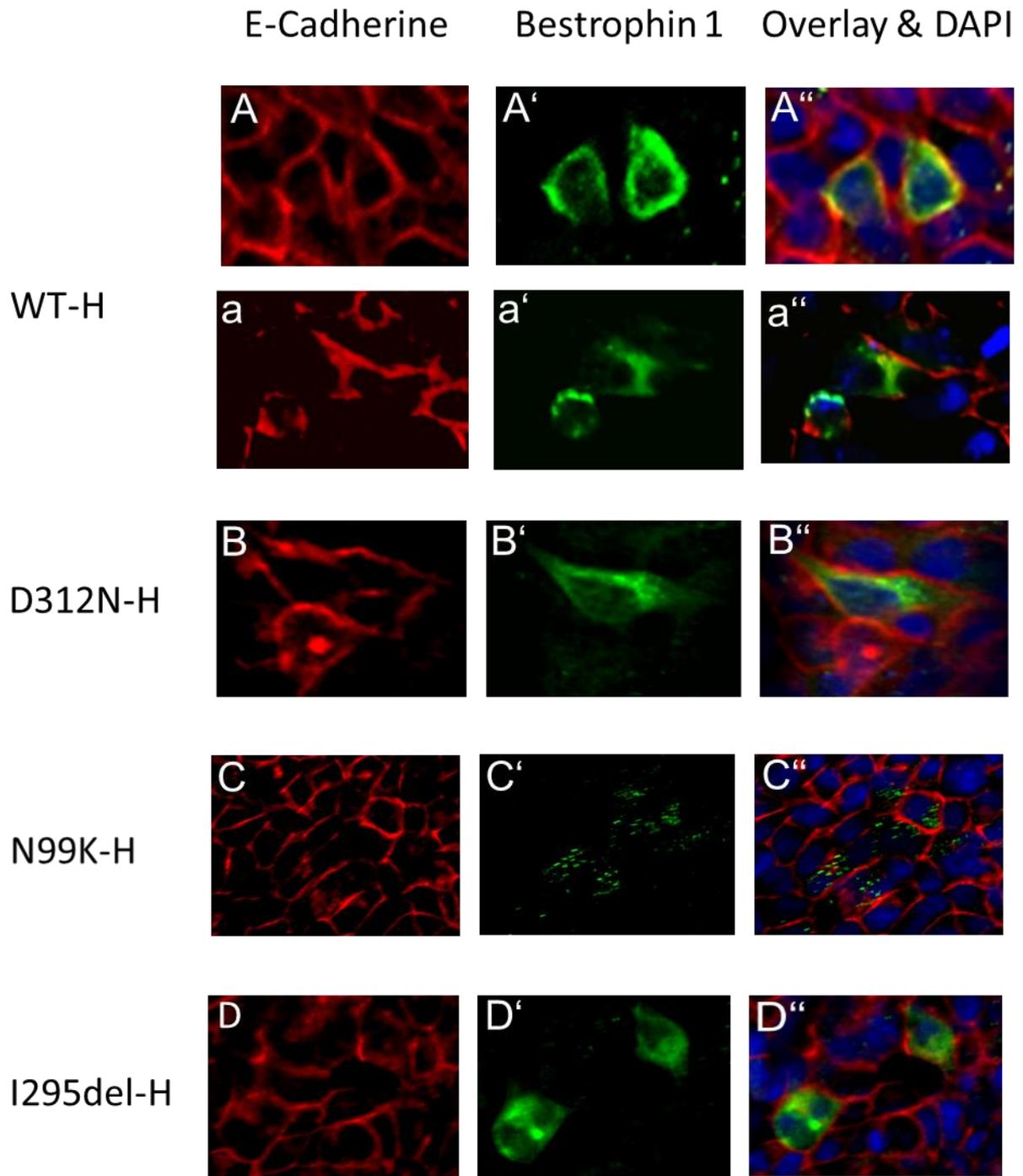


Abbildung 3-14 (vorherige Seite): Intrazelluläre Lokalisation des Bestrophin-1 mit E-Cadherin als Membranmarker.

A-D zeigt die Lokalisation des tight junction Protein E-Cadherin zur Veranschaulichung der Zellmembranen. Immunfärbung mit dem Antikörper Anti-E-Cadherin (Cell Signaling). A'-D' zeigt die Färbung des Bestrophin 1 Proteins mit BEST1 204-220 und A''-D'' zeigt die Zusammenführung der Einzelbilder mit DAPI-Kernfärbung. Die Zeilen A und a zeigen die Verteilung des Bestrophin 1 Wildtypproteins. Zeile B zeigt die Expression des Bestrophin 1-Proteins mit der Mutation p.D312N. Zeile C beschreibt die Expression des Bestrophin 1 mit der Mutation p.N99K. Zeile D stellt die Expression des Bestrophin 1 mit der Mutation p.I295del dar.

Rote Fluoreszenz: E-Cadherin; grüne Fluoreszenz: Bestrophin 1; blaue Fluoreszenz (DAPI): Zellkerne; Scale bar: 20 µm. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (Olympus Fluoview FV 10i) gemacht.

3.4 Interaktion des Bestrophin 1-Wildtypproteins mit mutiertem Bestrophin 1

3.4.1 Generierung einer MDCK-II-Flip-In Zelllinie

Für die Überprüfung der Interaktion des mutierten Bestrophin 1 mit dem Wildtyp-Bestrophin 1 wurde eine Zelllinie benötigt, die den Wildtyp stabil und unterscheidbar exprimiert. Die MDCK-II-Zelllinie bot sich, wie unter 3.3 beschrieben, als geeignete Zelllinie für die heterologe Expression der einzelnen Plasmide an.

Da jedoch MDCK-II-Zellen *hBEST1* nicht endogen exprimieren (siehe Abb. 3-13), wurde eine Zelllinie generiert, welche den Myc-Tag tragenden Wildtyp stabil exprimiert. Dazu wurde zunächst das Flip-In-System in die MDCK-II-Zellen eingeführt.

Für die Generierung der MDCK-II-Flip-In Zelllinie wurde zunächst die Mindestkonzentration an Zeocin bestimmt, die alle nicht transfizierten MDCK-II-Zellen abtötet (2.3.2.6). Die ermittelte Mindestkonzentration lag bei 680 µg/ml. Im Anschluss daran wurde eine Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.2.2) mit dem pFRT/lacZeo-Vektor durchgeführt, um ausreichende Mengen an kontaminationsfreier Plasmid-DNA für die Generierung der MDCK-II-Flip-In-Zelllinie zu erhalten.

Für die sich anschließende Transfektion wurde der pFRT/lacZeo-Vektor mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisiert. Dieses Vorgehen erhöhte die Chance, dass der Vektor sich so integrierte, dass die ATG-FRT-lacZ-Zeocin-Kassette und andere Elemente, die für die Expression in Säugerzellen nötig sind, nicht zerstört wurden.

Danach wurden die MDCK-II-Zellen mit dem pFRT/lacZeo-Vektor unter Verwendung des Lipofectamine LTX Kit transfiziert (2.3.2.5.1). Es wurden 4 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die transfizierten Zellen wurden so lange in Selektionsmedium (10 ml DMEM⁺⁺⁺ mit 680 µg/ml

Zeocin) gehalten, bis nur noch die Zellklone der erfolgreich transfizierten Zellen mit der in das Genom integrierten ATG-FRT-lacZ-Zeocin-Kassette auf den Platten wuchsen. Diese wurden von der Platte mit 2 µl Accutase abgelöst, wie in 2.3.2.1 beschrieben und auf jeweils einer 10 cm Petrischale ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz in zeocinhaltigem Medium kultiviert. Als bei Sichtkontrolle eine 100%ige Konfluenz auf den Platten erreicht war, wurden die Zellen, wie in 2.3.2.2 beschrieben, abgelöst und eingefroren (2.3.2.3).

3.4.2 Stabile Transfektion der MDCK-II-Flip-In-Zelllinie mit *hBEST1-MYC*

Für die stabile Transfektion der MDCK-II-Flip-In-Zelllinie wurde zunächst die Mindestkonzentration für das Selektionsantibiotikum Hygromycin B bestimmt (siehe 2.3.2.6). Diese lag bei 600 µg/ml. Im Anschluss wurde eine Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.2.2) mit dem pOG44-Plasmid durchgeführt. Dieses Plasmid wurde für die sich anschließende Doppeltransfektion unbedingt benötigt, da es die Expression der Flp-Rekombinase und so die Integration des pC5-BEST1-Myc-FRT-Plasmid über die FRT-Site in das Genom ermöglicht. Für die Co-Transfektion der MDCK-II-Flip-In Zelllinie wurden insgesamt 2 µg DNA, die sich aus dem pOG44-Plasmid und dem pC5-BEST1-Myc-FRT-Plasmid in verschiedenen Verhältnissen zusammensetzte, eingesetzt (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Verhältnisse der eingesetzten Menge pOG44-Plasmid: pC5-BEST1-Myc-FRT-Plasmid.

pOG44-Plasmid	pC5-BEST1-Myc-FRT-Plasmid
4	1
7	3
3	2
1	1
2	3
3	7
1	4

Die Co-Transfektion erfolgte in einer 6-Lochplatte. 24 h nach der Transfektion (siehe 2.3.2.5) wurde das Transfektionsmedium abgezogen und verworfen und die Zellen auf Petrischalen mit 10 cm Durchmesser passagiert (siehe 2.3.2.2). Die Zellkultur wurde mit Selektionsmedium (10 ml DMEM⁺⁺⁺ mit 600 µg/ml Hygromycin B) versetzt (siehe 2.3.2.6). Das Selektionsmedium wurde alle drei Tage gewechselt und die Platten nach überlebenden Zellen am Durchlichtmikroskop durchgemustert. Von der Platte mit dem Verhältnis pOG44-Plasmid zu pC5-BEST1-Myc-FRT-Plasmid von 3:2 wurde nach zwei Wochen ein Klon, wie in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben, passagiert und die Zellsuspension vollständig in eine einzelne Kavität

einer 6-Lochplatte gegeben. Die Zellen wurden in Selektionsmedium weiterkultiviert (siehe 2.3.1.3) und nach einer weiteren Passage auf einer neuen Petrischale unter Selektionsbedingungen weiterkultiviert (siehe 2.3.2.2). Die vollständig bewachsene Kulturschale wurde im Rahmen einer weiteren Passage (siehe 2.3.2.2) mit je 1 ml Zellsuspension auf sechs Petrischalen verteilt, von denen drei für die Kryokonservierung (siehe 2.3.2.3), eine für die DNA-Isolation (siehe 2.2.1.1), eine für die Proteinisolierung (siehe 2.2.1.4) und eine für die Weiterführung der Kultur unter Selektionsdruck (siehe 2.3.1.3) bestimmt waren.

Zunächst wurde die Integration des BEST1-Myc-Konstruktes in das Genom der MDCK-II-Zelllinie auf DNA-Ebene mittels einer PCR-Reaktion überprüft. Hierfür wurden spezielle Primer gegen den Myc-Tag designt (#3170/3171). Als Negativkontrolle diente DNA aus einer konfluent gewachsenen MDCK-II-Flip-In-Zellkultur. Für die PCR wurde DNA der Zelllinien MDCK-II-FI und MDCK-II-Best, sowie die DNA der Plasmide pC5-BEST1-Myc-FRT und pC3(+)-BEST1-His auf 10 ng/µl verdünnt und mit den Primern #3170-Best-MyFLa und #3171-BestMyFLb in einer PCR-Reaktion amplifiziert (siehe 2.2.4). Die PCR-Produkte wurden in einer Agarosegelelektrophorese ausgewertet (siehe 2.2.12.3). Es wurden Banden in der Höhe von 200 bp erwartet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-15 dargestellt.

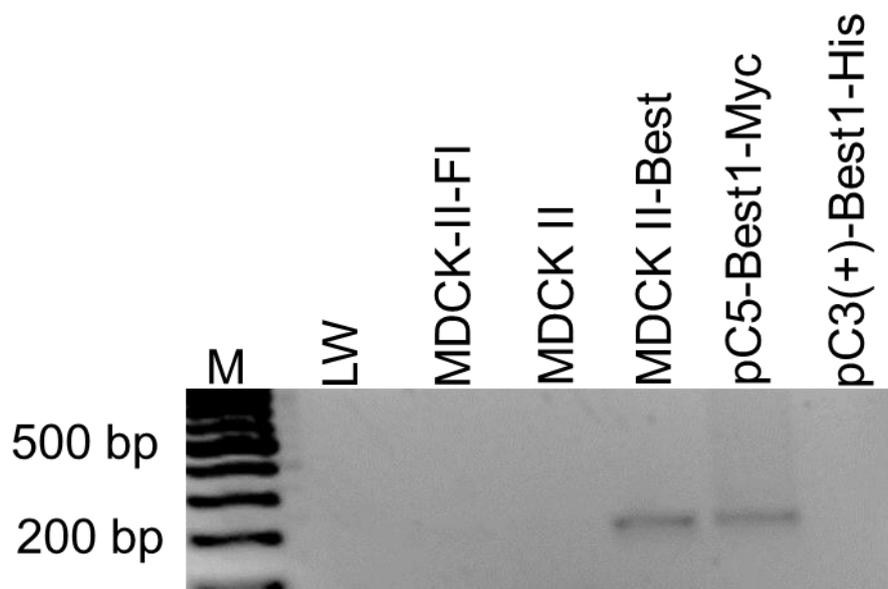


Abbildung 3-15: Nachweis des Einbaus des BEST1-Myc-Konstruktes in das MDCK-II-Genom auf DNA Ebene.

M: Marker 100 bp-DNA-Größenmarker; LW: Leerwert; Man kann bei den Plasmiden, die den Myc-Tag tragen, die entsprechende Bande bei 200 bp sehen.

Im nächsten Schritt wurde der Einbau des Plasmids auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und SDS-PAGE (2.2.12.1) und anschließendem Western Blot (2.2.12.2 und 2.3.5) nachgewiesen. Für die Immunfluoreszenz wurden 50 µl MDCK-II-Best-Zellen, entsprechend ca. 50.000 Zellen, auf einem Insert, das in die Kavität einer 24-Lochplatte passte (Wachstumsfläche ca. 59 mm²), ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz in Selektionsmedium weiterkultiviert (siehe 2.3.1.3). Danach wurden die Zellen fixiert (siehe 2.3.2.7) und mit einem bestrophinspezifischen Antikörper (anti-BEST1 E6-6) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Färbung wurde am Folgetag, wie in 2.3.7 beschrieben, mit dem Sekundärantikörper AlexaFluor488 anti Maus abgeschlossen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-16A dargestellt. Wie erwartet, erhält man im Bereich der Plasmamembran ein starkes Fluoreszenzsignal. Man kann jedoch auch im Zytoplasma der MDCK-II-Best-Zellen vor Allem um den Zellkern herum ein Fluoreszenzsignal erkennen. Dies ist der Tatsache zuzuschreiben, dass das Protein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) produziert und von dort aus durch das Zytoplasma in Richtung der Plasmamembran transportiert wird. Eine weitere Begründung für das Vorhandensein von Bestrophin 1 im Zytoplasma könnte in der Überexpression des Proteins begründet sein, da der CMV-Promotor, unter dessen Kontrolle die Translation stattfindet, sehr stark ist.

Für die Überprüfung der stabilen Integration und Expression des Genproduktes des BEST1-Myc-Konstrukts mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde Protein aus Zellen einer konfluent bewachsene Petrischale mit MDCK-II-BEST-Zellen, wie in 2.2.1.4 beschrieben, extrahiert. Als zusätzliche Kontrolle für die Expression des BEST1-Myc-Konstrukts wurde eine weitere Proteinprobe aus transient mit dem Plasmid pC5-BEST1-Myc-FRT transfizierten HEK293T/17-Zellen aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Protein aus MDCK-II-FI-Zellen und nicht transfizierten HEK293T/17-Zellen eingesetzt. Für die SDS-PAGE wurden 40 µg Gesamtprotein, wie in 2.2.12.1 beschrieben, aufgetragen. Danach wurden die Proteine mittels semi Dry Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und der Transfer mittels einer Ponceau S-Färbung überprüft (siehe 2.2.12.2). Der Nachweis des Myc-getaggten stabil exprimierten Bestrophins (siehe 2.3.5) erfolgte über einen Myc-Tag-spezifischen Antikörper, der an die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C in der Antikörperlösung in einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert. In Abbildung 3-16B sind die Ergebnisse des Myc-Tag-Nachweises gegen Protein aus MDCK-II-FI-Zellen als Negativkontrolle dargestellt. Die Banden bei ca. 70 kDa entsprechen dem Myc-getaggten Bestrophin 1.

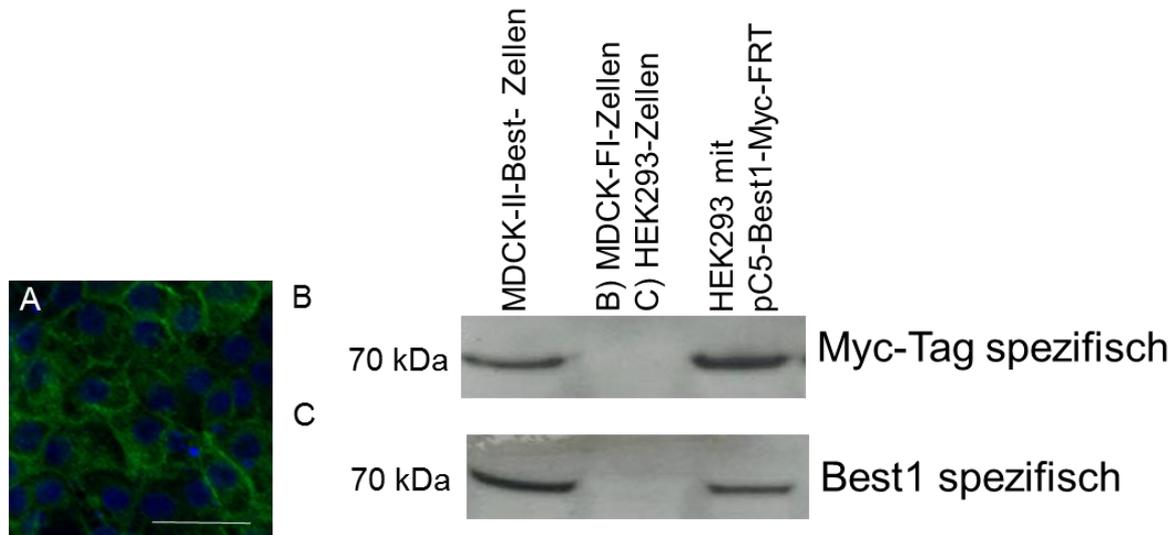


Abbildung 3-16: Darstellung der stabilen Transfektion mittels Immunhistochemie und SDS-PAGE und Western Blot.

A: Nachweis der Expression von Bestrophin 1 mittels Immunfluoreszenz. Grüne Fluoreszenz: Bestrophin 1; blaue Fluoreszenz: DAPI; Scale bar: 50 μm . Nachweis des Myc-Tag-gekoppelten Bestrophin 1 in der MDCK-II-Best-Zelllinie und in der transienten Expression in einer HEK293T/17-Zelllinie über B: einen Myc-Tag spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 20) mit MDCK-II-FI-Zellen als Negativkontrolle und C: mittels eines bestrophinspezifischen Antikörpers (anti-BEST1 C-14) mit nicht transfizierten HEK293T/17 Zellen als Negativkontrolle. Die Banden bei ca. 70 kDa in B und C entsprechen dem erwarteten Genprodukt.

Parallel erfolgte ein Nachweis des Myc-getaggten Bestrophins nach transienter Transfektion in HEK293T/17-Zellen über den Antikörper (anti-BEST1 C-14). In Abbildung 3-16C ist der spezifische Nachweis des exprimierten BEST1-Myc-Konstrukts in HEK293T/17-Zellen über die Bestrophin 1-Komponente dargestellt. Als Negativkontrolle wurde Protein aus untransfizierten HEK293T/17-Zellen eingesetzt.

3.4.3 Darstellung der Interaktion des Wildtyp-Genproduktes mit mutiertem Bestrophin 1

Im Rahmen dieses Projektes sollte ermittelt werden, ob die mutierten Proteinuntereinheiten des humanen Bestrophin 1 mit den nicht mutierten Proteinuntereinheiten interagieren. Diese möglichen Interaktionen sollten zunächst über Western Blot Experimente dargestellt werden. Dafür wurde Plasmid-DNA der Klone pC3(+)-BEST1-His, pC3(+)-BEST1-D312N-His, pC3(+)-BEST1-N99K-His und pC3(+)-BEST1-I295del-His mittels einer Plasmid-Maxipräparation (2.2.1.2.2) aus Bakterienzellen aufgereinigt und photometrisch quantifiziert (2.2.10.1).

Die stabile Zelllinie MDCK-II-Best mit Expression des MDCK-II-Best-Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 wurde mit jedem dieser Plasmide separat und transient nach dem

Protokoll 2.3.2.5.1 für MDCK-II-Best (6-Lochformat) mittels Lipofektion (2.3.2.5.2) transfiziert. Die Zellen wurden hierfür nicht auf Inserts ausgesät, da Ziel des Experimentes die Isolierung von Gesamtprotein war, wofür keine epithelialisierten Zellen benötigt wurden. In den Transfektionsansatz wurden je Plasmid 4 µg DNA eingesetzt. Aufgrund einer geringen Transfektionseffizienz wurden pro Plasmid drei 6-Lochplatten zusammengeführt, da sonst die Menge des exprimierten Proteins für den Nachweis des His-Tag im Western Blot und eine Aufreinigung der Proteine über den His-Tag nicht darstellbar waren. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 200 µl Lysispuffer mit 1 % Triton X-114 überschichtet und wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, extrahiert. Im Anschluss wurde ein Bradford-Assay (2.2.10.2) zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

Mit den Proben wurde zunächst eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli durchgeführt. Für das Experiment wurden 40 µg Gesamtprotein je Probe mit der entsprechenden Menge an reduzierendem 5 X SDS-PAGE-(Lämmli)-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen (2.2.12.1). Im Anschluss erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mittels semi dry blotting (siehe 2.2.12.2) und die Überprüfung der Übertragung mittels einer Ponceau S-Färbung. Danach wurden die Laufspuren auf der Membran und die Banden der Marker bei 70 kDa mit Bleistift markiert, um nach dem Entfärben und Blockieren eine Orientierung auf der Membran zu haben. Anschließend erfolgte die immunochemische Detektion des Myc-Tag-markierten Bestrophin (2.3.5) mit einem Myc-Tag-spezifischen Antikörper (Tabelle 21), an den die Meerrettichperoxidase gekoppelt war, in einer Verdünnung von 1:2000 über Nacht bei 4 °C auf einem Wipptisch (2.3.5). Das Ergebnis der Immundetektion ist in Abbildung 3-17 dargestellt.

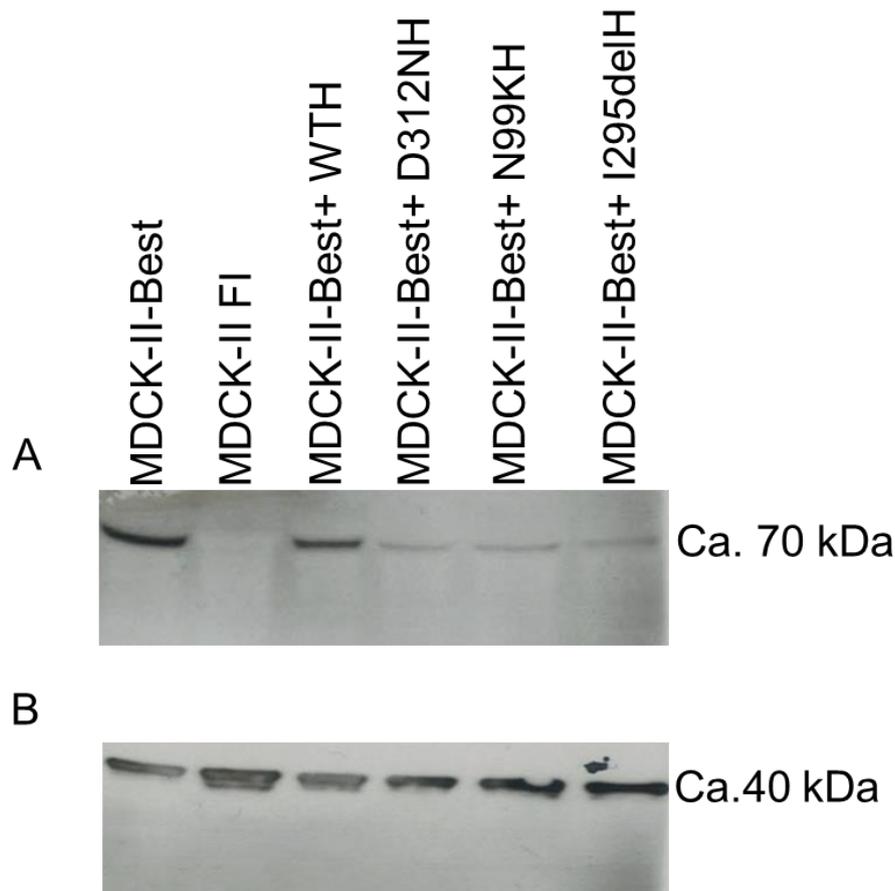


Abbildung 3-17: Immunfärbung gegen den Myc-Tag des Wildtyp Bestrophin 1 in der stabil transfizierten MDCK-II-BEST-Zelllinie zur Darstellung der Interaktion mit den mutierten Proteinuntereinheiten.

- A) Immunochemischer Nachweis des Myc-Tag mittels eines Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-Myc-Antikörpers (Abcam, UK). In Spur 1 ist ein Proteinextrakt der stabil transfizierten MDCK-II-Best-Zelllinie als Positivkontrolle für den Myc-Tag dargestellt. In Spur 2 ist Protein aus der MDCKII-FI-Zelllinie als Negativkontrolle gezeigt. In den Spuren 3 - 6 sieht man den Nachweis der stabilen Expression des Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1. In den jeweiligen Spuren sind die Ergebnisse der transienten Transfektion der MDCK-II-Best-Zelllinie dargestellt. In B) ist der Nachweis von Actin gezeigt, welches als Housekeeping-Protein zur Ladekontrolle verwendet wurde.

In Spur drei ist eine prominente Bande zu sehen, was zu erwarten war, da die beiden Wildtyp-Genprodukte miteinander interagieren und keine Beeinträchtigung der Expression erfolgen sollte. In den Spuren 4 bis 6 in denen die Proben der transient exprimierten Plasmide für die Mutationen p.D312N, p.N99K und p.I295del aufgetragen wurden, sind die Banden deutlich schwächer im Vergleich zu den Spuren 1 und 3, in denen die Proben aus der stabilen und der transienten Transfektion mit Wildtyp-Bestrophin 1 aufgetragen wurden. Die Anwesenheit der Mutationen p.N99K und p.I295del wirkt sich negativ auf die Expression des Wildtyps aus.

Dieses Ergebnis konnte in Wiederholungen dieses Experimentes bestätigt werden, was gegen die Transfektionseffizienz als Ursache dieses Ergebnisses spricht.

Mit den, für das in Abbildung 3-17 gezeigte Experiment, gewonnenen Proteinproben wurde ein Nachweis mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper als Gegenprobe auf die His-markierten transient exprimierten Proteine des mutierten Bestrophin 1 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Western-Blot identisch mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper (Tabelle 21), an den bereits die Meerrettichperoxidase gekoppelt war, wiederholt. Der His-Tag-Nachweis fiel aufgrund der geringen Transfektionseffizienz und dem dadurch reduzierten Anteil His-markierter Proteine im Proteinextrakt, schwächer aus.

Die Banden zu den Mutationen p.D312N, p.N99K und p.I295del in Abbildung 3-18A, sind alle in gleichem Maße etwas schwächer als die Bande für das Wildtypprotein, was zeigt, dass die Mutationen exprimieren, allerdings etwas schwächer als der Wildtyp. Die Ladekontrolle mit Actin in Abbildung 3-18B zeigt eine gleichmäßige Beladung aller Spuren.

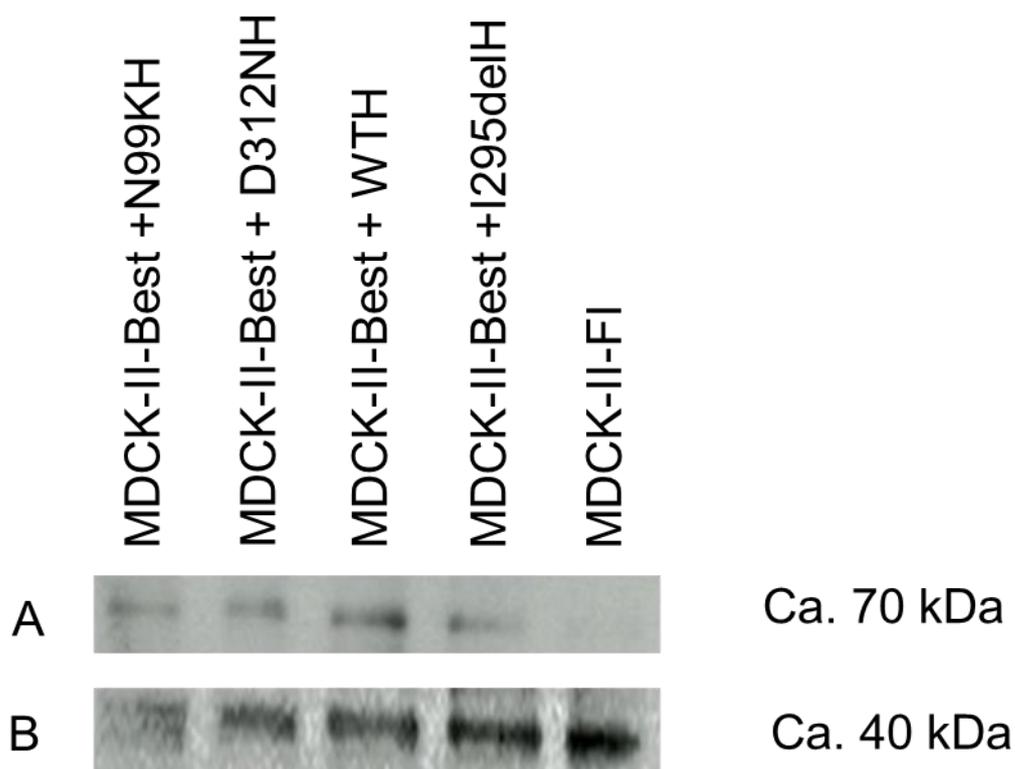


Abbildung 3-18: Western Blot zum Nachweis des His-Tag-tragenden Bestrophin 1.

In A) ist der immunochemische Nachweis eines His-Tag an Proteinextrakten aus transient mit BEST1-His-transfizierten MDCK-II-BEST-Zellen gezeigt. Spur 1 zeigt Bestrophin 1 mit der Mutation p.N99K, Spur 2 zeigt Bestrophin 1 mit der Mutation p.D312N. In Spur 3 ist der Wildtyp aufgetragen und in Spur 4 Bestrophin 1 mit der Mutation p.I295del. Spur 5 enthält als Negativkontrolle Protein aus MDCK-II-FI Zellen. In B) ist als Ladekontrolle der immunochemische Nachweis gegen Actin dargestellt.

3.4.4 Darstellung der Interaktion von mutierten und nicht mutierten *hBEST1*-Genprodukten über den His-Tag

Zur Darstellung der Interaktion des stabil exprimierten Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 mit dem transient exprimierten His-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 bzw. dem transient exprimierten His-Tag-markierten Bestrophin 1 mit den Mutationen p.N99K, p.D312N oder p.I295del wurden die, in 3.3 gewonnenen, Proteinextrakte über eine His-Tag-Affinitätssäule aufgereinigt (2.3.4). Für den folgenden Western-Blot wurde der zweite Elutionsschritt verwendet, da der Bradford-Assay (2.2.10.2) darin die höchste Proteinkonzentration ergab.

Für den Nachweis, des mit den His-Tag-markierten Bestrophin 1-Proteinen interagierenden Myc-Tag-markierten Wildtyp Bestrophin 1, wurden jeweils 10 µg aufgereinigtes Protein in einem Western-Blot (2.2.12.1 und 2.2.12.2) eingesetzt. Für die Western-Blot-Experimente waren 10 µg Protein ausreichend, da durch die Aufreinigung über den His-Tag die Proteinproben nicht nur aufgereinigt, sondern auch aufkonzentriert wurden. Im Western-Blot wurde ein Myc-Tag-spezifischer Antikörper (Tabelle 21) in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Das Ergebnis der Immundetektion ist in Abbildung 3-19 dargestellt. Auch in diesem Falle stellte die äußerst geringe Transfektionseffizienz ein Problem dar. Diese konnte jedoch nicht erhöht werden, da die MDCK-II-Best-Zelllinie äußerst empfindlich auf die Transfektion reagiert hat und die Transfektanten binnen kürzester Zeit abgestorben sind. Aus diesem Grund wurden auch pro Mutation drei 6-Lochplatten zusammengeführt, um ausreichend Material für den Nachweis der His-getaggen Proteine zu erhalten.

In Abbildung 3-19 wird die Interaktion zwischen den beiden Wildtyp-Proteinen gezeigt. Eine entsprechende Interaktion zwischen dem Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 und dem Bestrophin 1 mit der Mutation p.D312N ist dort ebenfalls deutlich erkennbar. Zur Gegenprobe wurde das Experiment mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper, der bereits an die Meerrettichperoxidase gekoppelt war, identisch wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-20 dargestellt.

Wie man in Abb. 3-20 erkennen kann, war die Affinitätsaufreinigung mit den Wildtypproteinen am erfolgreichsten, was zu erwarten war. Das gleiche gilt in etwas abgeschwächtem Maß für die Mutation p.D312N, die die geringste Pathogenität von allen untersuchten Mutationen zeigt. Für die Mutationen p.N99K und p.I295del fällt der Nachweis mit dem His-Tag spezifischen Antikörper am schwächsten aus. Dieses Resultat könnte sich aus einer geringen Aufreinigung in der Affinitätschromatographie ergeben und würde sich mit dem fehlenden Nachweis von den Mutationen p.N99K und p.I295del in Abb. 3-19 decken. Dagegen spricht jedoch das in Abb. 3-18 gezeigte Ergebnis, welches zeigt, dass der His-getaggte Wildtyp und die Mutationen einigermaßen gleichstark exprimiert sind.

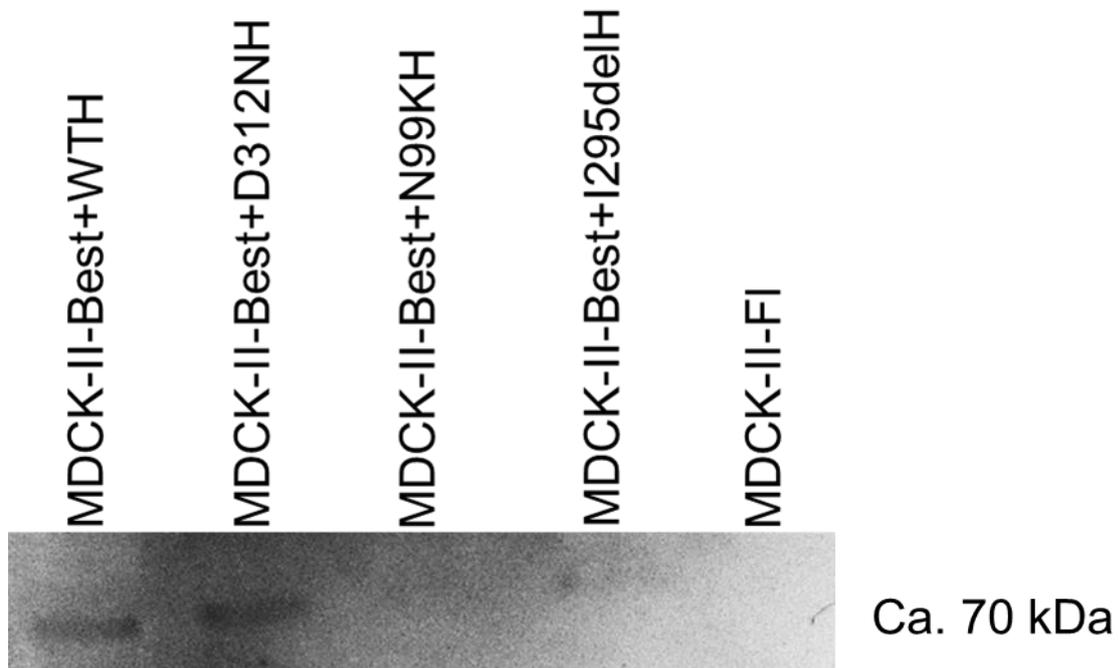


Abbildung 3-19: Interaktion des stabil exprimierten Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 mit den transient exprimierten His-Tag-markierten Mutationen nach His-Tag-Affinitäts-Aufreinigung.

Die His-Tag-Affinitäts-gereinigten Proteine wurden über den Myc-Tag-detektiert. Die linke Spur zeigt eine Bande als Interaktion zwischen dem Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 und dem His-markierten Wildtyp-Bestrophin 1. Die zweite Spur zeigt eine Bande als Interaktion mit dem His-markierten Bestrophin 1 mit der p.D312N-Mutation, die noch vergleichbar stark ausfällt. Die dritte Spur zeigt die Interaktion mit dem p.N99K-mutierten His-Tag-markierten Bestrophin 1. Hier ist keine Bande zu sehen. In der vierten Spur wurde die Interaktion mit dem p.I295del-mutierten Bestrophin 1 getestet. Die Bande ist nur sehr schwach zu erkennen und weist auf eine sehr geringe Interaktion hin. Die fünfte Bande zeigt die Negativkontrolle, die aus MDCK-FI-Zellen stammt und keine Bande zeigt.

Andererseits kann man in Abb. 3-17 erkennen, dass die his-getaggten Mutationen deutlich schwächer mit dem Myc-getaggten Wildtyp exprimieren. Dies könnte auf eine instabile Expression der Mutationen zurückzuführen sein, was dann im Ergebnis weniger His-getaggtes Protein bedeutet. Wenn durch die instabile Expression die Interaktion zwischen Wildtyp und Mutationen beeinträchtigt wird, fällt im Gegenzug der Nachweis für den Myc-Tag deutlich schwächer aus, was sich wiederum mit den erhaltenen Ergebnissen deckt.

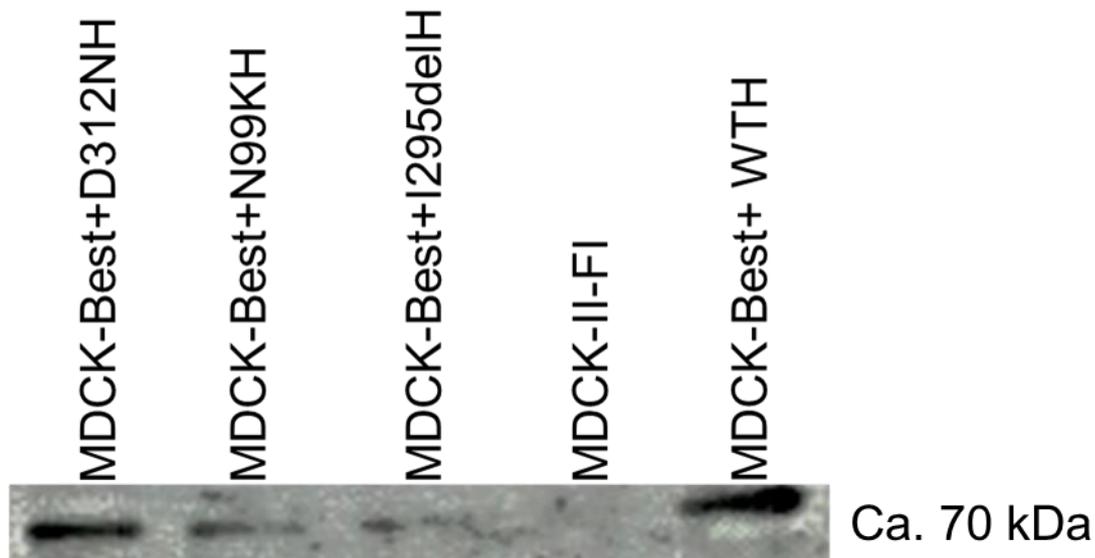


Abbildung 3-20: Nachweis des affinitätsgereinigten transient exprimierten His-Tag-markierten Bestrophin 1.

In der Abbildung ist die Aufreinigung von His-Tag-markiertem Bestrophin 1 mittels Affinitäts-Säule in der Wildtypform und mit Mutationen gegen den Myc-Tag tragenden Wildtyp dargestellt. Die erste Spur zeigt den Nachweis des His-Tag-markierten Bestrophin 1 mit der Mutation p.D312N. In der zweiten Spur ist die Expression des His-markierten Bestrophin 1 mit p.N99K-Mutation dargestellt. Die dritte Spur zeigt das His-Tag-markierte Bestrophin 1 mit p.I295del-Mutation. Für die vierte Spur wurde Protein aus MDCKII-FI-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt. In Spur fünf ist der His-Tag-markierte Wildtyp dargestellt. Es zeigt sich ein reduzierter Nachweis His-Tag-markierten Proteins in den Spuren der Mutationen p.N99K und p.I295del. Die Mutationen p.D312H stellt sich geringfügig schwächer dar als der Wildtyp.

3.4.5 Immunhistochemischer Nachweis der Interaktion der mutierten *hBEST1*-Genprodukte in MDCK-II-Best-Zellen

Die MDCK-II-Best-Zellen wurden, wie in 2.3.2.5.2 und 2.3.2.7 beschrieben, mit Wildtyp und mutierten His-Tag-markierten Bestrophin 1-Konstrukten (pC3(+)-BEST-WT-His, pC3(+)-BEST-N99K-His, pC3(+)-BEST-D312H-His und pC3(+)-BEST-I295del-His) transient transfiziert und nach 16-18 Stunden Expression fixiert. Danach erfolgte die Doppelfärbung nach dem in 2.3.7 beschriebenen Protokoll. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-22 dargestellt. Durch den geringen Zell-Zell-Kontakt sieht man in Abbildung 3-22A und A', dass die beiden Wildtyp-Genprodukte nicht zur Plasmamembran transportiert wurden und im Zytoplasma liegen blieben, die Signale für beide Markierungen kolokalisieren jedoch außerhalb der Zellkerne, was auf eine noch nicht abgeschlossene Epithelialisierung der Zellen schließen lässt. Wenn die Zellen jedoch ohne Transfektion wachsen epithelialisieren sie bei engem Kontakt, was sich mit einem Myc-Tag spezifischen Antikörper über die Lokalisation des stabil exprimierten Bestrophin-1 darstellen lässt (siehe Abbildung 3-21).

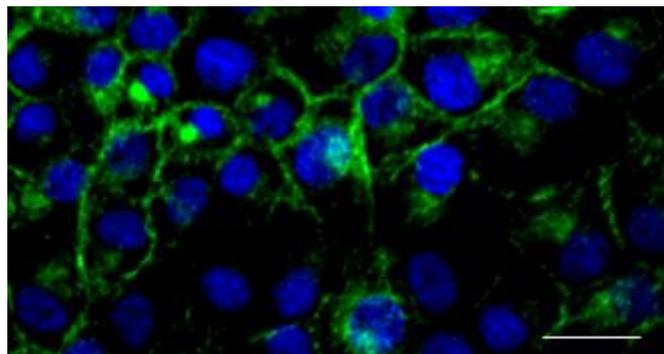


Abbildung 3-21: Nachweis der Epithelialisierung von untransfizierten MDCK-Best-Zellen mit einem Myc-Tag-spezifischen Antikörper.

Die Abbildung zeigt den immunhistochemischen Nachweis der Epithelialisierung von nicht transfizierten MDCK-Best-Zellen mit einem Myc-Tag-spezifischen Antikörper. Die abgeschlossene Epithelialisierung erkennt man an der membranständigen Lokalisation des Bestrophin 1. Grüne Fluoreszenz: Anti Myc-Tag; blaue Fluoreszenz: DAPI; Maßstab: 20 µm.

In Abbildung 3-22B ist die Transfektion mit dem p.D312N-mutierten *hBEST1*-Genprodukt zusammen mit der stabilen Expression des Myc-Tag-tragenden Wildtyp-Genprodukts dargestellt. Eine klare Membranlokalisierung ist nicht zu erkennen. Das Wildtyp-Genprodukt liegt vor Allem nukleär und in geringerem Maße zytoplasmatisch vor (Abbildung 3-22B). Das mutierte Protein hingegen liegt um den Zellkern herum und zytoplasmatisch vor (Abbildung 3-22B'). Diese Verteilung zeigte sich auch bei der nicht epithelialisierten Einzelzelle in Abbildung 3-22b-b'', in der das Wildtyp-Genprodukt bei fehlendem Zell-Zell-Kontakt vor Allem

im Zellkern liegen blieb und nicht zur Plasmamembran transportiert wurde. Das mutierte Genprodukt blieb vor Allem um den Zellkern herum liegen, lag aber auch zytoplasmatisch vor (Abbildung 3-22b'). Im Overlay sieht man die Kolokalisation der beiden Proteine im Zytoplasma (Abbildung 3-22b' und Abbildung 3-22b'').

Nach Transfektion mit der Mutation p.N99K lag das Wildtyp-Genprodukt vergleichbar der Transfektion mit der Mutation p.D312N im Kern vor und der Transport zur Plasmamembran durch das Zytoplasma war reduziert (Abbildung 3-22C). Das mutierte Genprodukt lag im Zytoplasma und teilweise in granulären Strukturen verteilt vor. (Abbildung 3-22C'). Im Overlay konnte eine Kolokalisation mit dem Wildtyp-Genprodukt im Zytoplasma gezeigt werden (Abbildung 3-22C'').

Im Falle der Mutation p.I295del ist die Expression des Wildtyp-Genprodukts reduziert und das Wildtyp-Genprodukt liegt etwas stärker exprimiert im Zellkern und weniger stark zytoplasmatisch vor (Abbildung 3-22D). Das mutierte Genprodukt wurde dagegen stärker exprimiert und lokalisierte im Zytoplasma (Abbildung 3-22D'). Abbildung 3-22D'' zeigt im Overlay eine schwache Kolokalisation im Zytoplasma.

Die MDCK-II-BEST-Zellen reagierten äußerst empfindlich auf die Transfektion. Die Fixierung der Präparate musste vor der vollständigen Epithelialisierung der Zellen vorgenommen werden, da die Transfektanten mit zunehmender Kulturdauer abstarben.

Dies zeigte sich in der Morphologie der Zellen und schränkte die Aussagekraft zur Lokalisation der Genprodukte in der Zellmembran ein. Dass die MDCK-II-Best-Zellen epithelialisieren, wenn man sie ausreichend lange und untransfiziert auf Filtern wachsen lässt, erkennt man in Abbildung 3-16A und Abbildung 3-21.

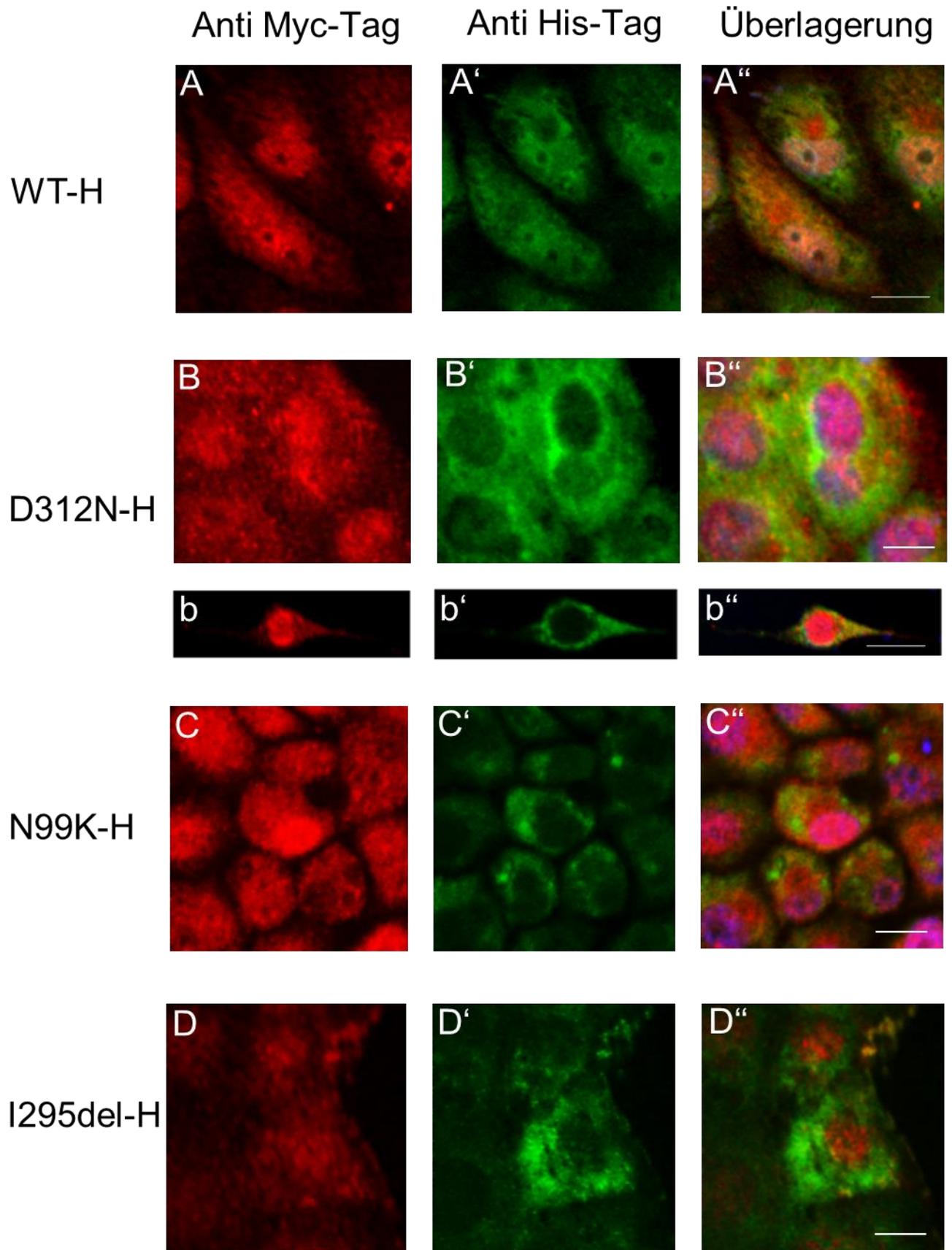


Abbildung 3-22 (vorherige Seite): Immunhistochemischer Nachweis des koexprimierten Bestrophin 1-Wildtyp und der Mutationen p.D312N, p.N99K und p.I295del.

A) zeigt das stabil exprimierte Myc-Tag-markierte Wildtyp-Bestrophin 1. A' zeigt das transient exprimierte His-Tag-markierte Wildtyp-Bestrophin 1. A'' zeigt die Überlagerung der Myc-Tag und His-Tag-tragenden Proteine in Gelb mit der DAPI-Kernfärbung in Blau.

B und b) zeigen das stabil exprimierte Myc-Tag-markierte Wildtyp-Bestrophin 1. B' und b' zeigen das transient exprimierte Bestrophin 1 mit der Mutation p.D312N. B'' und b'' zeigen die Überlagerung des Wildtyp-Bestrophin 1 und des p.D312N-Bestrophin 1 in Gelb mit DAPI-Kernfärbung in Blau.

C) zeigt das stabil exprimierte Myc-Tag-markierte Wildtyp-Bestrophin 1. C' zeigt das transient exprimierte Protein mit der Mutation p.N99K und C'' zeigt die Überlagerung der beiden Nachweise in Gelb mit DAPI-Kernfärbung in Blau.

D) zeigt das stabil exprimierte Myc-Tag-markierte Wildtyp-Bestrophin 1. D' zeigt das transient exprimierte Protein mit der Mutation p.I295del. D'' zeigt die Überlagerung der beiden Nachweise in Gelb mit DAPI-Kernfärbung in Blau.

Der Masstab entspricht 20 µm. Die Aufnahmen wurden mit einem CLSM generiert.

Ein quantitativer Vergleich der Kolokalisationsanalyse ist in Tabelle 24 dargestellt. Es kam wieder die Korrelation nach Pearson zum Einsatz (siehe 2.3.7.3).

Tabelle 24: Kolokalisationsanalyse des transient exprimierten Bestrophin 1 mit dem stabil exprimierten Wildtyp in MDCK-II-Best-Zellen

Plasmid	Pearson's Koeffizient
MDCK-II-Best-His-	0,83±0,042
MDCK-II-Best D312N-His	0,82±0,009
MDCK-II-Best-N99K-His	0,74±0,01
MDCK-II-Best-I295del-His	0,31±0,7

Die beiden Wildtypproteine zeigen mit einem Wert von 0,83 eine weitreichende Kolokalisation. Der Polymorphismus p.D312N-His zeigt mit einem Wert von 0,82 eine ähnliche Kolokalisation mit dem Wildtyp. Die Mutation p.N99K-His zeigt mit dem Wert 0,74 eine große, aber dennoch reduzierte Kolokalisation mit dem Wildtyp, die Mutation p.I295del-His zeigt nahezu keine Kolokalisation mit dem Wildtypprotein.

4 Diskussion

Die juvenile vitelliforme Makuladegeneration M. Best ist eine degenerative Erkrankung der Retina (OMIM: # 153700), die auf Mutationen im *hBEST1*-Gen zurückzuführen ist (Petrukhin et al., 1998, Marquardt et al.1998).

Mutationen im *hBEST1*-Gen beeinträchtigen die Proteinfunktion und die intrazelluläre Lokalisation des humanen Bestrophin 1 (Davidson et al., 2009; Yu et al., 2007; Qu, et al. , 2006; Xiao, Hartzell, & Yu, 2010; Milenkovic VM, et al, 2011). Die Folge hiervon sind fokale Ablösungen der Netzhaut vom RPE im Bereich der Makula (juvenile vitelliforme Makuladegeneration) oder multifokale Ablösungen bis in die Netzhautperipherie (autosomal rezessive Bestrophinopathie). Die entstandenen serösen Abhebungen der Netzhaut sind mit Interzellularflüssigkeit gefüllt (Guziewicz KE, et al. 2018).

Mutationen im *hBEST1*-Gen zeigen reduzierte Penetranz und variable Expression (Wabbels et al., 2006; Bitner et al., 2011;Kinnick et al., 2011). Die Ursachen der reduzierten Penetranz und der variablen Expression sind nach wie vor ungeklärt, es wurden aber unter Anderem Umwelteinflüsse und der Einfluss anderer Gene als Ursachen mitvermutet (Wilhelm Seyffert, 2003; Shawky RM, 2014). Ziel dieses Projektes war es, die Ursachen der reduzierten Penetranz beim Morbus Best näher zu beschreiben.

Zu diesem Zweck wurden Interaktionsstudien mit zwei Missense Mutationen (p.D312N und p.N99K), sowie einer Deletionsmutante (p.I295del) im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Die Mutationen p.N99K und p.I295del zeigen nachweislich eine reduzierte Penetranz und variable Expressivität (Wabbels et al., 2006; Sun et al., 2002; Yu et al., 2007). Die Sequenzvariation p.D312N wird als Polymorphismus eingestuft, da sie in heterozygoten Mutationsträgern keine Symptome hervorruft (Burgess et al., 2008). Liegt die Mutation allerdings homozygot oder compound heterozygot vor, zeigen die Mutationsträger Symptome und selbst eine Coexpression mit dem Wildtyp-Genprodukt rettet die Proteinfunktion nicht (Yu et al., 2007;Krämer et al., 2000). Diese Beobachtung wird als dominant negativer Effekt interpretiert, der sich auch bei der Mutation p.I295del einstellt. Das mutierte Protein hindert das Wildtypprotein daran, seine Funktion zu erfüllen (Yu et al., 2007). Auch für die Mutation p.N99K wird ein dominant negativer Effekt diskutiert (Sun et al., 2002). Im Gegensatz dazu steht die Haploinsuffizienz, bei der die gebildete Menge an Wildtypprotein irgendwann nicht mehr ausreicht, um die vollständige Proteinfunktion zu erfüllen.

Zur Beschreibung des Expressionsverhaltens der Mutationen wurde das *hBEST1*-Gen in einen His-Tag-tragenden Expressionsvektor (3.1.3, 3.1.5) kloniert und die Missense Mutationen p.D312N und p.N99K sowie die Deletionsmutante p.I295del eingefügt (3.1.4).

Zur Darstellung der Interaktion der Mutationen untereinander wurden zunächst die Vektoren in HEK293T/17 Zellen transfiziert und das Wildtyp-Genprodukt Bestrophin 1 exprimiert. Mit den Genprodukten wurden kommerziell erhältliche C-terminale anti-Bestrophin-Antikörper im

Western Blot-Experiment optimiert und ein N-terminaler anti-Bestrophin-Antikörper charakterisiert.

Für die Lokalisationsstudien wurden zunächst MDCK-II-Zellen eingesetzt, da diese epithelialisieren, wenn sie auf Filtereinsätzen angezogen werden (Davidson et al., 2009) und eine Epithelialisierung der Zellen Voraussetzung für die intrazelluläre Verteilung der *hBEST1*-Genprodukte war. Die epithelialisierten MDCK-II-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren transient transfiziert und die intrazelluläre Lokalisation der exprimierten Genprodukte wurde immunhistochemisch dargestellt (3.3).

Für die Untersuchung der Interaktion des Wildtyp-Bestrophin 1 mit den mutierten Genprodukten wurde eine MDCK-II-Zelllinie generiert, die ein Myc-Tag-tragendes Wildtyp-Bestrophin 1 stabil exprimiert (3.4.1, 3.4.2). Dieser Schritt war notwendig, da die MDCK-II-Zelllinie Bestrophin1 nicht endogen exprimiert. In diese Zelllinie wurden die Expressionsvektoren transient transfiziert und die Interaktion der Wildtyp-Genprodukte mit den transient exprimierten *hBEST1*-Genprodukten im Western-Blot (3.4.3, 3.4.4) und immunhistochemisch (3.4.5) untersucht.

4.1 Untersuchung der Expression und Lokalisation der *hBEST1*-Genprodukte in MDCK-II-Zellen

Die im Rahmen dieses Projektes hergestellten Vektorkonstrukte mit His-Tag wurden zunächst transient in epithelialisierenden MDCK-II-Zellen exprimiert, um das Verhalten der Genprodukte einzeln zu untersuchen. Mittels Immunhistochemie konnten die heterolog exprimierten Genprodukte in den Zelllinien lokalisiert werden. Das His-markierte Wildtyp-Bestrophin 1 wurde, wie unter physiologischen Bedingungen, zur Plasmamembran transportiert (Abbildung 3-14A-A“), was erwartet wurde. Dies zeigte, dass der His-Tag keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation hatte. Waren die Zellen nicht dicht genug gewachsen, oder waren, aufgrund der Lipofektion durch zytotoxische Effekte Lücken im Zellrasen entstanden, blieb das Wildtyp-Genprodukt im Zytoplasma liegen (Abbildung 3-14a-a“). Aufgrund der Mutation p.D312N lokalisierte das Genprodukt generell im Zytoplasma (Abbildung 3-14B-B“). Dieses Ergebnis deckt sich mit einer anderen immunhistochemischen Studie in MDCK-II-Zellen, die eine punktförmige, jedoch großflächigere Verteilung zeigte, als für die Mutation p.N99K (Davidson et al., 2009). Allerdings steht das Resultat im Gegensatz zu einer Studie in HEK293-Zellen die besagt, dass mit 48 % nahezu die Hälfte des Genproduktes in der Plasmamembran lokalisiert ist (Yu et al., 2007). Durch die Mutation p.N99K wurde auch unter Epithelialisierung eine zytoplasmatische Verteilung erzwungen, jedoch lokalisierte das Genprodukt in granulären Strukturen. Bei diesen granulären Strukturen könnte es sich um Transportvesikel handeln oder um Proteasomen, in denen das fehlerhafte Protein abgebaut wird (Abbildung3-14C-C“). Eine

vorhergehende Studie in HEK293 Zellen zeigte, dass eine separate Expression des mutierten Gens eine drastische Reduktion des Chloridionenstroms über die Plasmamembran zur Folge hatte (Sun et al., 2002). In der dort durchgeführten Oligomerisierungsstudie mit Bestrophin 1 wurden Membranen von transient co-transfizierten HEK293 Zellen mit einem Detergenz solubilisiert. Diese Vorgehensweise setzt voraus, dass das Protein zur Plasmamembran transportiert wird, was aber in einem deutlichen Gegensatz zu einer Studie, die das exprimierte Wildtyp-Genprodukt in HEK293 Zellen über Immunfluoreszenz nicht an der Plasmamembran, sondern im Zytoplasma lokalisierte, steht (Davidson et al., 2009). Allerdings ist festzuhalten, dass für elektrophysiologische, also rein funktionelle Untersuchungen, diese Transportfehler keine Auswirkungen auf die Ergebnisse hatten. Diese Beobachtung wurde im Rahmen einer Studie bestätigt, in der HEK- und RPEJ-Zellen zum Einsatz kamen und identische Ergebnisse mit beiden Zelllinien erzielt wurden (Yu et al., 2007). Allerdings sollten im Falle von Proteintransport- und -lokalisationsstudien entsprechend geeignete Zellsysteme wie z.B. die MDCK-Zelllinie zum Einsatz kommen (Davidson et al., 2009).

Die Mutation p.I295del lag ebenfalls in zytoplasmatischer Verteilung vor, vergleichbar mit der Mutation p.D312N (Abbildung 3-14D-D“). Für die Mutation p.I295del war ein dominant negativer Effekt in HEK293 Zellen beschrieben worden, der auch bei Co-expression mit dem Wildtyp nicht abgefangen werden konnte (Yu et al., 2007). Die Ergebnisse dieser funktionellen Untersuchungen (Yu et al., 2007; Sun et al., 2002) decken sich mit den hier vorgelegten Ergebnissen, da immunhistochemisch gezeigt werden konnte, dass die hier untersuchten Mutationen nur eine teilweise bis gar keine Membranlokalisierung zeigten, was die Proteinfunktion nachhaltig negativ beeinflussen sollte.

Für die Lokalisationsstudie wurde deshalb in dieser Arbeit die MDCK-II-Zelllinie gewählt, da diese als polarisiertes Zellsystem kultiviert werden konnte, in dem die Proteine gleich einem Abschlußgewebe exprimiert und lokalisiert sind. Für derartige Lokalisationsstudien sind HEK293 Zellen nicht geeignet, da die Zellen nicht epithelialisierbar sind und so keine Proteinverteilung, die einem Abschlussgewebe gleicht erzielt werden kann (Davidson et al., 2009).

Der Grund, dass die hier untersuchten Mutationen alle reduzierte Penetranz zeigen, ist bisher noch nicht geklärt. Allerdings könnte die Beobachtung, dass die Mutationen alleine eine Reduktion des Chloridionenstromes erzeugen und auch nach Co-Transfektion mit dem Wildtyp keine nennenswerte Verbesserung der Proteinfunktion eintritt (Yu et al., 2007), dafür sprechen, dass die Patienten aufgrund einer dominant negativen Wirkung erkranken. Dagegen spricht die reduzierte Penetranz. Allerdings kann diese auch auf der Promotorstärke, anderen Genen oder Umweltfaktoren beruhen (Davidson et al., 2009 ;Uggenti C et al., 2016).

In einer weiteren Studie wurde die Mutation p.D312N zusammen mit hBest2 getestet. Bei dieser Kombination zeigte sich kein Effekt auf die Proteinfunktion von hBest2 und so wurde eine Ersatzfunktion durch hBest 2 für das defekte hBest 1 postuliert. Auch die Co-Expression der Mutation p.I295del mit einem Heteromer aus hBest 1 und hBest 2 zeigte keinen negativen Effekt (Yu et al., 2007). Gegen diese Hypothese spricht allerdings die Tatsache, dass hBest 2 nur in nicht pigmentierten Epithelzellen exprimiert wird und daher im RPE nicht zusammen mit Bestrophin 1 arbeiten kann (Zhang et al., 2010).

Die postulierte Funktion des Bestrophin 1 als Ionenkanal (Sun et al., 2002 ;Yu et al., 2007) unterstützt die Interpretation, dass die Mutationen einen dominant negativen Effekt zeigen, weil es durch die Punktmutationen zu Ladungsänderungen im Protein und zu Konformationsänderungen kommen kann. In der Folge würde die Pore des Ionenkanals zu schmal für den Durchstrom von Chloridionen. Dieser Effekt würde auch bei Co-Expression mit dem Wildtyp auftreten und eine Wirkung auf den Chloridionenfluss haben. Dieser würde vom Verhältnis Wildtyp-Genprodukt zu mutiertem Genprodukt abhängen, was wiederum eine Erklärung für die reduzierte Penetranz darstellen könnte (Vaisey G, 2016). Sollte sich herausstellen, dass Bestrophin kein Kanal sein sollte, was im deutlichen Gegensatz zu den strukturellen Ergebnissen stehen würde, müsste man die These umdenken.

Eine weitere Erklärung für die Fehlfunktion von Bestrophin1 könnte in einer mutationsbedingten Fehlfaltung des Proteins bestehen. Diese würde durch intrazelluläre Kontrollsysteme wie die Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation erkannt und würde zum Abbau des mutierten Proteins führen, was wiederum eine Erklärung für die reduzierte Penetranz darstellen könnte, da das Wildtyp-Genprodukt seine Funktion an der Plasmamembran erfüllen kann, aber in geringerer Menge als physiologisch notwendig gebildet wird (Uggenti et al., 2016).

Das tight junction protein E-Cadherin zeigt neben der physiologischen Lokalisation in der Plasmamembran der epithelialisierten Zellen eine geringe Lokalisation im Zytoplasma aufgrund des intrazellulären Transportes vom Zellkern zur Membran (Abbildung 3-14). Um den Korrelationskoeffizienten nach Pearson zu ermitteln, wurde verglichen, ob in dem jeweiligen Farbkanal, also in diesem Falle dem roten und dem grünen Kanal einer Bilddatei, Pixelpositionen überlappen (Tabelle 22). Pixel, die das E-Cadherin während des Transports durch das Zytoplasma zeigen, stellen also keine funktionell relevante Kolo-kalisation dar. Bedingt durch die granuläre Verteilung des p.N99K-Genproduktes und aufgrund der zytoplasmatischen Verteilung des p.I295del-Genproduktes, welches ebenfalls die Plasmamembran nicht erreichte, konnte für diese beiden Mutationen keine positive Korrelation errechnet werden.

4.2 Untersuchung zur Interaktion der *hBEST1*-Genprodukte mit Wildtyp-Bestrophin 1 in MDCK-II-Best-Zellen

Im Rahmen dieses Projektes wurde des Weiteren eine Interaktionsstudie mit His-getaggen mutierten Genprodukten und His-getagtem Wildtyp-Bestrophin 1 gegen ein stabil exprimiertes Myc-getaggtetes *hBEST1* Wildtyp-Genprodukt in MDCK-II-Best-Zellen durchgeführt.

Zunächst wurde ein Experiment mit Gesamtprotein durchgeführt, um den Myc-Tag tragenden Wildtyp über ein Western Blot Experiment mit immunhistochemischem Nachweis nachzuweisen. Das Ergebnis des Western Blots mit anschließendem immunhistochemischen Nachweis mit einem Myc-Tag spezifischen Antikörper spricht für einen dominant negativen Effekt der Mutationen. Dies begründet sich durch die Beobachtung, dass die Bandenstärke des Myc-Tag tragenden Wildtyp-Genproduktes bei Co-Expression mit den mutierten Genprodukten deutlich geringer ist, als bei Co-Expression mit dem Wildtyp-Genprodukt (Abbildung 3-17A). Dieses Ergebnis spricht für eine Abschwächung der Expression des Myc-Tag tragenden Wildtyp-Genproduktes, wenn es mit den mutierten Genprodukten koexprimiert wird. Dies könnte als Hinweis auf die im vorherigen Kapitel diskutierte Haploinsuffizienz gedeutet werden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, die über funktionelle Nachweise, mittels Patch Clamp Experimenten, einen deutlich reduzierten Chloridionenfluss der hier untersuchten Mutationen zeigen konnten, der als dominant negativer Effekt interpretiert wurde (Sun et al., 2002; Yu et al., 2007).

Des Weiteren wird das hier diskutierte Ergebnis durch das Gegenexperiment, das über einen His-Tag spezifischen Nachweis verlief, gestützt. Auch hierfür kam Gesamtprotein, das aus der MDCK-II-Best-Zelllinie, die transient mit den His-Tag tragenden mutierten Proteinen transfiziert wurde, zum Einsatz und es wurde ein Western Blot mit anschließendem histochemischem Nachweis mit einem His-Tag spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Expression der mutierten Proteine war gleichmäßig innerhalb der Zellen aber nur gering, was auf die sehr niedrigen Transfektionseffizienzen zurückzuführen war. Die etwas stärkere Bande bei der Koexpression des His-Tag- tragenden Wildtyp-Genproduktes mit dem Myc-Tag tragenden Wildtyp-Genprodukt spricht für die erwartete Interaktion der beiden Wildtypproteine (siehe Abbildung 3-18A).

Im nächsten Schritt wurden die Proteinproben über den His-Tag aufgereinigt und aufkonzentriert. Der anschließende Western Blot mit histochemischem Nachweis durch einen Myc-Tag spezifischen Antikörper zeigte, wie zu erwarten war, eine Bande, die die beiden Wildtyp-Genprodukte erzeugt haben. Die Bande, die aufgrund der Interaktion der Mutation p.D312N mit dem Myc-Tag tragenden Wildtypprotein auftritt, war bereits deutlich schwächer (siehe Abbildung 3-19). Diese, wenn auch schwache Interaktion könnte einen Hinweis auf die

reduzierte Penetranz, die die Mutation zeigt, darstellen. Durch die Interaktion mit dem Wildtyp könnte eine geringe Restfunktion des Proteins erhalten bleiben, selbst wenn der Chloridionenfluss durch die Koexpression nach wie vor negativ beeinflusst wird (Yu et al., 2007). Die Mutationen p.N99K und p.I295del zeigen keine Interaktion mit dem Wildtyp-Genprodukt, was die Hypothese, dass die Patienten aufgrund von Haploinsuffizienz erkranken, unterstützt. Mutationsträger mit diesen Mutationen sind besonders schwer betroffen (Wabbels et al., 2006), wenn die Krankheit ausbricht, was auf eine variable Expression des Wildtyp-Genproduktes zurückzuführen sein könnte.

Auch zu diesem Experiment wurde ein Gegenexperiment mit einem His-Tag spezifischen Antikörper durchgeführt (siehe Abbildung 3-20). Wiederum ist die Bande, mit den beiden Wildtyp-Genprodukten am prominentesten, was auf eine bessere Interaktion der beiden Genprodukte schließen lässt. Die Interaktion des Myc-Tag tragenden Wildtyp-Genprodukts mit der Mutation p.D312N zeigt eine schwächere Bande. Diese deutet auf eine weniger stabile, aber vorhandene Interaktion der beiden Proteine hin. Die Banden für die Mutationen p.N99K und p.I295del sind beide sehr schwach, was auf eine nicht vorhandene Interaktion mit dem Wildtyp-Genprodukt hindeutet. Dieses könnte die reduzierte Penetranz für die Mutationen p.N99K und p.I295del erklären, da durch die fehlende Interaktion mit dem Wildtyp-Genprodukt allein die Stärke der Expression des Wildtyp-Genproduktes für den Chloridionenstrom verantwortlich wäre (Yu et al., 2007; Sun et al., 2002).

4.3 Untersuchung der Expression und Lokalisation der *hBEST1*-Genprodukte in MDCK-II-Best-Zellen

Nach dem Nachweis einer reduzierten Interaktion des Wildtyp-Genproduktes mit den mutierten Genprodukten, wurde die Lokalisation des His-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 und der mutierten His-Tag-markierten Genprodukte in MDCK-II-Best-Zellen im Vergleich zum stabil exprimierten Myc-Tag-markierten Wildtyp-Genprodukt optisch dargestellt. Die beiden Wildtyp-Genprodukte kolokalisieren im Zytoplasma und nicht, wie erwartet, an der Plasmamembran (Abbildung 3-22A). Dies liegt jedoch nicht an einer Überexpression oder an der Myc-Tag-Markierung, sondern an der unvollständigen Epithelialisierung der Zellen, wie man an nicht transfizierten MDCK-II-Best Zellen, die auf Filtereinsätzen angewachsen sind, bei vollständiger Konfluenz fixiert wurden und durch Nachweis des Myc-Tag-markierten Wildtyp-Genproduktes in der Plasmamembran, erkennt. Die Zellen epithelialisieren hier und das Wildtyp-Genprodukt wird, wie erwartet, zur Plasmamembran transportiert (siehe Abbildung 3-21). Allerdings ist festzuhalten, dass generell deutlich mehr des Myc-Tag-tragenden Wildtyp-Genproduktes im Kern liegen bleibt (siehe Abbildung 3-22 erste Spalte). Dies könnte zwei mögliche Gründe haben: 1. Der Myc-Tag könnte den Transport des

Wildtyp-Genproduktes erschweren oder 2. die unvollständige Epithelialisierung der Zellen. Ein Zusammenspiel aus beiden Gründen ist ebenfalls nicht auszuschließen, wobei die fehlende Epithelialisierung der wahrscheinlichere Grund ist, da nur wenig Protein im Kern und im Zytoplasma liegen bleibt, wie in Abbildung 3-21 gezeigt. Dass die Zellen vor Abschluss der Epithelialisierung fixiert werden mussten, ist der Tatsache geschuldet, dass die MDCK-II-Best-Zellen äußerst empfindlich auf die transiente Transfektion mit den mutierten Proteinen reagiert haben und die Transfektanten sonst alle abgestorben wären. Da dies für alle transient exprimierten Konstrukte gleich war, waren konkrete Aussagen zur Proteinlokalisierung nur bedingt zu treffen. Dass die mutierten Genprodukte nicht im Kern liegen geblieben sind, könnte der Überexpression der Konstrukte geschuldet sein, die sich aus dem CMV-Promotor der Vektoren ergibt und der Transfektion einer Zelle mit mehreren Vektoren gleichzeitig.

Es könnte aber auch sein, dass sich die Mutanten besser und leichter in Transportvesikel packen lassen, als der Myc-Tag tragende Wildtyp und so eine Konkurrenzsituation innerhalb der transfizierten Zellen entsteht. Dies würde bedeuten, dass der Myc-Tag bedingt ursächlich für die kernständige Lokalisation des Wildtypproteins ist und nicht nur die nicht abgeschlossene Epithelialisierung.

Im Falle des Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 und der Mutante p.D312N ist das mutierte Genprodukt vor Allem um den Zellkern herum und im Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 3-22B-B'' und b-b'') und das Wildtyp-Genprodukt ist hauptsächlich nukleär lokalisiert. Ein kleiner Teil des Wildtyp-Genprodukts gelangt jedoch ins Zytoplasma und zur Plasmamembran (siehe Abbildung 3-22B). Dies könnte zumindest eine Teilfunktion des Proteins erzeugen, was auch eine mögliche Erklärung für die reduzierte Penetranz der Erkrankung sein könnte (Boon et al., 2013). Auch die Western Blot Experimente mit Gesamtprotein (siehe 3.4.3 und 3.4.4, Abbildung 3-17, Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20) und dem über den His-Tag aufgereinigten Protein ergaben eine Intertaktion zwischen Wildtyp und Mutante, was erneut für eine gewisse Restfunktion des Proteins spräche und eine mögliche Erklärung für die reduzierte Penetranz und den milden Verlauf darstellen könnte.

Das Genprodukt der Mutation p.N99K liegt hauptsächlich im Zytoplasma und da teilweise in granulären Strukturen vor. Das mutierte Genprodukt kolokalisiert im Zytoplasma mit dem Wildtyp, nicht jedoch an der Plasmamembran (Abbildung 3-22C-C''). Das Wildtyp-Genprodukt lag bei Expression der Mutation p.N99K hauptsächlich nukleär vor, wurde aber in größerem Ausmaß als bei den Mutationen p.D312N und p.I295del ins Zytoplasma und zur Plasmamembran transportiert. Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass die Mutationsträger aufgrund von Haploinsuffizienz erkranken, da die Menge an Wildtyp-Genprodukt ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr ausreicht, um den negativen Effekt der Mutation, der bereits mit funktionellen Untersuchungen gezeigt wurde, auszugleichen (Sun et al., 2002). Des Weiteren

könnte dieses Ergebnis eine mögliche Erklärung für die reduzierte Penetranz, die die Mutation p.N99K zeigt, darstellen, da durch das Wildtyp-Genprodukt an der Plasmamembran eine Restfunktion des Wildtyp-Genproduktes erhalten bleiben würde.

Das Genprodukt der Mutation p.I295del wurde stärker exprimiert als das Wildtyp-Genprodukt (Abbildung 3-22D-D''). Dieser Befund wird nicht nur über den immunhistochemischen Nachweis gestützt, sondern ebenfalls über ein Western Blot Experiment, das zeigt, dass die Bandenintensität des mutierten Proteins, das mit dem Wildtyp koexprimiert wurde, deutlich abgeschwächt ist im Vergleich zu der Bandenintensität des Myc-Tag tragenden Wildtyp-Genproduktes oder der beiden koexprimierten Wildtyp-Genprodukte (Abbildung 3-17). Das mutierte Genprodukt blieb dabei zytoplasmatisch. Das Wildtyp-Genprodukt blieb im Zytoplasma liegen (Abbildung 3-22D-D''). Die Mutation p.I295del hat einen dominant negativen Effekt auf den Chloridionenfluss, der auch bei Co-Expression mit dem Wildtyp nicht abgefangen werden kann, was über Patch Clamp Experimente an HEK-Zellen bereits nachgewiesen werden konnte (Yu et al., 2007). Die Wirkung des Wildtyp-Genproduktes reicht also auf Dauer nicht aus, um eine normale Proteinfunktion aufrecht zu erhalten.

Der Hintergrund den die Färbungen der MDCK-II-Best-Zellen zeigen, ist unter anderem auf die Überexpression der mutierten Proteine zurückzuführen, da die Zellen bei der transienten Transfektion in der Lage sind, mehrere Plasmide aufzunehmen (Johnson et al., 2015). Es ist daher wahrscheinlich, dass in einer Zelle mehr als eine Kopie des mutierten Genkonstruktes exprimiert wird. Dadurch kommt es zu einer Verfälschung der Ergebnisse, da sich so die Wirkung der Mutation aufgrund der Überexpression verstärkt, die Funktion des Wildtyp-Genproduktes aber geschwächt wird.

Eine weitere Frage, die in diesem Zusammenhang geklärt werden muss, ist die nach der Stabilität der Expression der einzelnen Genprodukte. Die Expression des Wildtyp-Genproduktes findet stabil statt (siehe Abbildung 3-16). Die Expression der Mutation p.D312N scheint vergleichbar mit der des Wildtyps, obwohl die Lokalisation zytoplasmatisch ist (siehe Abbildung 3-14B-B''; Abbildung 3-22B-B''; Abbildung 3-22b-b''). Am instabilsten stellt sich die Expression der Mutation p.N99K dar, die größtenteils in granulären Strukturen und nur wenig im Zytoplasma verteilt vorliegt. Bei diesen granulären Strukturen könnte es sich um Proteasomen handeln, da sich die Lokalisation allergrößtenteils auf diese beschränkt, was sich beim immunhistochemischen Nachweis durch eine sehr intensive, granuläre Immunmarkierung zeigt (Abbildung 3-14B-B'' und Abbildung 3-22B'-B''; Davidson et al., 2009). Die Mutation p.I295del wird wiederum stabil exprimiert und scheint die Expression des Wildtyp-Genproduktes zu unterdrücken (siehe Abbildung 3-22D und Abbildung 3-17), was für den bereits postulierten dominant negativen Effekt sprechen könnte (Yu et al., 2007).

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Interaktionsstudien und der morphologischen Studien legen den Schluss nahe, dass der späte Ausbruch der Erkrankung im Falle der hier untersuchten Mutationen p.N99K und p.I295del auf Haploinsuffizienz zurückzuführen ist (Wabbels et al., 2006). Die deutlich abgeschwächten Banden in den Western Blot-Ergebnissen können als eine verminderte Expression des Wildtyp-Genprodukts gedeutet werden, wenn die jeweiligen Mutationen anwesend waren. Das bedeutet, dass die Gendosis des gesunden Allels auf Dauer deutlich, aufgrund der Expression der Mutanten reduziert ist und nicht ausreicht, um die notwendige Proteinfunktion aufrecht zu erhalten. Allerdings können die Überexpression und die heterologe Expression in einem Zellsystem, was aus der Hundeniere stammt zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, da die Signale für den Proteintransport in den RPE-Zellen und den MDCK-II-Zellen nicht identisch sind bzw. unterschiedlich interpretiert werden (Johnson AA et al., 2013, Doumanov et al., 2013). Des Weiteren gilt es zu beachten, dass die MDCK-II-Zelllinie aus dem Hund nicht exakt das gleiche Expressionsmuster der untersuchten Mutationen zeigen könnte, wie eine humane RPE-Zelllinie (Johnson AA et al. 2013).

4.5 Ausblick

Ein weiterer wichtiger Schritt wäre es, unter nativen Bedingungen festzustellen, ob die mutierten mit den nicht mutierten Proteinuntereinheiten interagieren.

Klarheit könnte da auch die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen bringen, da die entsprechende genetische Ausstattung und ihre Kontrolle in jeder Zelle der Patienten vorhanden sind. Dieses native Zellsystem hat sich bereits als sehr nützlich für das Verständnis von Pathomechanismen erwiesen (Johnson AA, et al., 2015). Es gibt schon einige erfolgreiche Versuche auf diese Weise RPE-Zellen herzustellen (Buchholz DE et al., 2009, Singh R et al., 2013). Marmorstein et al. haben bereits eine Studie veröffentlicht, in der eine induzierte humane pluripotente Stammzelllinie einer ARB-Patientin untersucht wurde (Marmorstein AD et al., 2018). Im Rahmen dieser Studie (Marmorstein et al., 2018) wurde die „Null“-Hypothese, die Burgess et al. 2008 aufgestellt haben, durch ein reverse Transkription PCR- Experiment, welches selbst kleinste Mengen an mRNA identifizieren kann, widerlegt, die besagte, dass das fehlerhafte Bestrophin mit der Mutation p.R200*, die einen vorzeitigen Transkriptionsstop verursacht, über den nonsense mediated decay (NMD) abgebaut wird (Burgess R et al., 2008). Des Weiteren haben Marmorstein et al. herausgefunden, dass das Expressionsniveau von Bestrophin bei der ARB reduziert ist, was sich auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt und dass die Phagozytose der äußeren Photorezeptorsegmente reduziert war (Marmorstein AD, et al., 2018).

Eine weitere Frage, die nach wie vor ungeklärt ist, betrifft die Proteinfunktion. Hierzu gibt es mehrere Hypothesen. Eine davon besagt, dass Bestrophin 1 ein Chloridionenkanal ist (Sun et al., 2002). Eine andere Hypothese weist dem Protein eine Kontrollfunktion für einen spannungsabhängigen Kalziumkanal zu (Reichhart et al., 2010, Hartzell et al., 2008; Marmorstein AD, et al., 2015). Eine weitere These schreibt dem Protein eine zytosolische Funktion zu, die darin besteht, die Kalziumhomöostase im ER zu kontrollieren (Barro-Soria et al., 2010, Strauss et al., 2012). In einem aktuellen Review von Johnson et al. werden diese drei Hypothesen bezüglich der Proteinfunktion bestätigt (Johnson et al., 2017). Die Hypothese, dass Bestrophin 1 einen Anionenkanal darstellt, wurde an humanen fetalen RPE-Zellen getestet und bestätigt. Diese Zellen wurden mit der Mutation p.W93C und dem Wildtyp über Adenovirus-mediierten Gentransfer transduziert, als Kontrollen kamen untransduzierte humane fetale RPE-Zellen zum Einsatz. Das Ergebnis der Studie zeigte den dominant negativen Effekt der untersuchten Mutation, dass Best1 einen Beitrag zum transepithelialen Potential leistet und dass Best1 den Anionenfluss beeinflusst (Marmorstein et al., 2015). Diese Ergebnisse, die mit humanen fetalen RPE-Zellen erzielt wurden, bestätigen die Daten, die bereits bei der Verwendung von HEK-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten erzielt wurden (Sun et al., 2002; Qu et al., 2003). Weitere Bestätigungen der Kanalhypothese wurden durch Milenkovic et al. an humanen, induzierten pluripotenten Stammzellen, die zu RPE ausdifferenziert wurden, erbracht (Milenkovic et al., 2015). Auch einige strukturelle Ansätze an mutiertem und nichtmutiertem Hühner- und *Klebsiella* Best1 bestätigen die Kanalhypothese (Vaisey et al., 2016; Kane Dickson et al., 2014; Yang et al., 2014). Allerdings ist zu bedenken, dass die festgestellten Veränderungen der Proteinfunktion nur indirekte Beobachtungen der Proteinfunktion darstellen (Johnson et al., 2017). Auch die Interaktion mit der β 4-Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals $Ca_v1.3$ und die Kontrolle der Kalziumhomöostase der RPE-Zellen konnte in mehreren Studien nachgewiesen und bestätigt werden (Reichhart et al., 2010; Milenkovic et al. 2011; Marmorstein et al., 2015).

Ein weiterführendes Projekt zu dieser Arbeit wäre es, zu überprüfen, was passiert, wenn man das Wildtypprotein unter Mutationsbedingungen, also im Überschuss, im Beisein der Mutationen exprimiert. Dies könnte, je nach Ergebnis, einen möglichen Therapieansatz bedeuten. Erste Ergebnisse hierzu gibt es von Marmorstein et al., die im Rahmen einer Studie das Wildtypprotein mittels Adenovirus-assoziiertem Gentransfer in humanen fetalen RPE-Zellen überexprimiert haben. Diese Überexpression führte zu einer Zunahme der Proteinfunktion bezüglich des transepithelialen Potentials (Marmorstein et al., 2015). Ob und wie sich diese Zunahme auf die Zellen und die Proteinfunktion auswirken, bleibt zu prüfen. Weiterhin bleibt zu prüfen, ob sich diese Funktionssteigerung auch im Beisein der Mutationen zeigt.

5 Zusammenfassung

Das retinale Pigmentepithel (RPE) erfüllt einige wichtige Funktionen in der Versorgung der Photorezeptoren. Dabei besteht eine enge funktionelle Interaktion zwischen den Photorezeptoren und den Zellen des RPE. Bestrophin 1 ist das Genprodukt des *BEST1*-Gens, welches notwendig für die Kalziumhomöostase der RPE-Zellen ist, indem es als Chloridionenkanal das Gegenion zum Kalzium transportiert, also einen Ionenkanal darstellt. Bestrophin1 wird an der basolateralen Membran des RPE exprimiert und steht so in direktem Kontakt zu den Photorezeptoren (Johnson et al., 2017). Mutationen des *BEST1*-Gens führen zu verschiedenen Erkrankungen des Auges wie der juvenilen vitelliformen Makuladystrophie nach Best, der adulten vitelliformen Makuladystrophie, der autosomal dominanten Vitreochoroidopathie, der autosomal rezessiven Bestrophinopathie und der Retinitis pigmentosa (Johnson et al., 2017). Die Erkrankungen manifestieren sich durch einen reduzierten Chloridionenfluss und erzeugen reduzierte Ableitungen im EOG (Yu et al., 2007; Sun et al., 2002). Die Mutationen zeigen reduzierte Penetranz und variable Expressivität (Johnson et al., 2017). Die häufigste Form ist der autosomal dominant vererbte M. Best. Der M. Best zeigt kein einheitliches Alter bei Beginn der Erkrankung und keinen einheitlichen zeitlichen Verlauf der Progression. Oftmals entwickeln Träger ursächlicher Mutationen (z.B. p.N99K, p.D312N oder die Deletionsmutante p.I295del) keine Symptomatik (reduzierte Penetranz).

Ziel dieser Arbeit war es, den Pathomechanismus der reduzierten Penetranz für die Missense Mutationen p.N99K, p.D312N und die Deletionsmutante p.I295del zu untersuchen.

Dafür wurde zunächst mittels RT-PCR die DNA des *BEST1*-Gens aus humaner RNA gewonnen. Das Gen wurde in den pCR[®]2.1TOPO[®]-Vektor kloniert und mit einem His-Tag versehen. Im Anschluss wurde das His-markierte *BEST1*-Gen in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor kloniert. Mittels Mutagenese-PCR wurden dann die Mutationen p.D312N, p.N99K und p.I295del eingefügt. Die Konstrukte wurden in MDCK-II-Zellen heterolog exprimiert und immunhistochemisch untersucht.

Hier zeigte sich, dass das Wildtyp-Genprodukt wie erwartet, zur Plasmamembran transportiert wurde, während das Genprodukt der p.D312N-Mutation gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorlag, ebenso wie das Genprodukt der p.I295del-Mutation. Das Genprodukt der p.N99K-Mutation lag ebenfalls zytoplasmatisch vor, jedoch in granulären Strukturen.

Für die Untersuchung der Interaktion der mutierten Genprodukte mit dem Wildtyp wurde eine MDCK-II-Zelllinie generiert, die ein Myc-Tag markiertes Wildtyp-Bestrophin 1 stabil exprimiert. Diese Zelllinie wurde mit dem His-Tag-markierten *hBEST1*, das die Mutationen p.D312N, p.N99K und p.I295del trug, transfiziert und die heterologe Expression mit Hilfe der SDS-PAGE im Western Blot mit Myc- und His-Tag-spezifischen Antikörpern dargestellt. Der Proteinnachweis mit dem Myc-Tag spezifischen Antikörper zeigte deutlich geringere Mengen

Genprodukt bei Expression der Mutationen p.D312N-His und den Mutationen p.N99K und p.I295del im Vergleich zum Wildtyp-Genprodukt. Mit dem His-Tag-spezifischen Antikörper wurde die Interaktion näher untersucht. Es konnte eine unwesentlich stärkere Expression des Wildtyp-Genprodukts im Vergleich zu den Mutationen nachgewiesen werden. In einer Immunpräzipitation über den His-Tag konnte Myc-Tag-markiertes Wildtyp-Genprodukt mit dem Wildtyp-Genprodukt präzipitiert werden. Mit dem p.D312N-His-Genprodukt konnte Myc-Tag-markiertes Wildtyp-Bestrophin 1 in vergleichbarer Menge isoliert werden. Über die Genprodukte p.N99K-His und p.I295del-His waren kaum nachweisbare Mengen Myc-Tag-markiertes Wildtyp-Bestrophin 1 zu isolieren. Die Gegenprobe mit dem His-Tag spezifischen Antikörper zeigte erneut eine vergleichbare Menge des Wildtyp-Genproduktes und des p.D312N-Genproduktes, wohingegen die Signale der Mutationen p.N99K und p.I2915del schwächer waren.

Darüber hinaus wurde eine immunhistochemische Studie durchgeführt. Auch hier konnte eine Kolo-kalisation der beiden Wildtypproteine nachgewiesen werden. Allerdings war die Lokalisation der Wildtyp-Genprodukte zytoplasmatisch und nukleär und damit nicht physiologisch, da die Zellen die Epithelialisierung noch nicht abgeschlossen hatten. Die Genprodukte der Mutation p.D312N-His lagen um den Zellkern herum und zytoplasmatisch vor. Die Mutation p.N99K lag zytoplasmatisch in granulären Strukturen vor, wurde aber nicht zur Plasmamembran transportiert. Das Wildtypprotein lag vor Allem nukleär vor. Bei der Mutation p.I295del war die Expression des Wildtyp-Bestrophin 1 stark reduziert und das Protein war zytoplasmatisch lokalisiert, während das mutierte Protein stark überexprimiert war und zytoplasmatisch vorlag.

Diese Ergebnisse können eine Erklärung für die reduzierte Penetranz, die die Mutationen p.N99K und p.I295del zeigen, darstellen. Ausserdem lassen sie den Schluss zu, dass die Patienten aufgrund von Haploinsuffizienz erkranken.

6 Summary

The retinal pigment epithelium (RPE) performs several important functions in support of the photoreceptor cells. There is a close functional interaction between the photoreceptors and the cells of the RPE. Bestrophin 1 is encoded by *BEST1* which is necessary for intracellular calcium signalling in RPE cells because it acts as a chloride channel shuttling the counter ion for calcium. Bestrophin 1 is localised to the basolateral membrane of RPE cells and thus stands in direct contact with the photoreceptors (Johnson et al., 2017). Mutations in *BEST1* cause various retinal diseases such as Best's vitelliform macular dystrophy, adult-onset vitelliform macular dystrophy, autosomal dominant vitreoretinopathopathy, autosomal recessive bestrophinopathy and retinitis pigmentosa (Johnson et al., 2017). The diseases are characterised by a reduced EOG and an abolished or diminished chloride conductance (Sun et al., 2002 ; Yu et al., 2007). The most frequent disorder caused by mutations in *BEST1* is the juvenile vitelliform macular degeneration (Best disease), an autosomal dominant maculopathy. There is no common age at onset for Best disease neither is there a constant rate of progression. In some mutations (i.e. p.N99K, p.D312N, and the deletion mutant p.I295del) carriers frequently do not develop symptoms (reduced penetrance).

The aim of this study was to investigate the pathomechanism of reduced penetrance in the missense mutations p.N99K and p.D312N and the deletion mutant p.I295del.

For this purpose, the cDNA of the *BEST1* gene was first obtained by means of RT-PCR from human RPE-RNA. The gene was cloned into the pCR[®]2.1TOPO[®] vector and a His-Tag label was added. Subsequently the BEST1-His construct was cloned into the pcDNA3.1(+) expression vector. Mutations p.N99K, p.D312N and p.I295del were inserted by mutagenesis PCR into the pcDNA3(+)-BEST1-His plasmid. The constructs were heterologously expressed in MDCK-II cells and immunohistochemistry was applied.

The gene product of the wildtype construct was localized to the plasma membrane while the p.D312N gene product was distributed evenly in the cytoplasm, as the p.I295del gene product did. The p.N99K gene product also remained cytoplasmic, but localized into granular structures.

To investigate the interaction of the wildtype and the mutant gene products a cell line was generated stably expressing a Myc-Tag-labeled wildtype Bestrophin 1. This cell line was transfected with the mutant His-tagged constructs and the heterologous expression was probed in SDS-PAGE and Western blot with Myc-tag and His-tag specific antibodies. Immunostaining with a Myc-tag specific antibody revealed less gene product of the wildtype construct upon co-expression with the mutant constructs. Immunostaining for the His-tag revealed a slightly stronger expression of the wildtype construct compared to the mutant constructs. Immunoprecipitation for the His-tag revealed comparable signals for p.D312N-His and the wildtype gene product while for the p.N99K-His gene product and the p.I295del-His

only insignificant signals were detected. An interaction between the wildtype gene products could also be shown with the His-tag specific antibody. The interaction between the mutant gene products with the Myc-tagged wildtype Bestrophin 1 gene product was weaker.

An immunohistochemical study was performed. Here, a colocalization of the two wildtype gene products could be demonstrated. However, the colocalization was cytoplasmic and nuclear because the cells had not fully completed epithelialization which resulted in non-physiological distribution. The mutation p.D312N-His was present surrounding the nucleus and in the cytoplasm, whereas the wildtype protein was located nuclear but also cytoplasmic and membranous. The mutation p.N99K-His was cytoplasmic and in granular structures. Most of the wildtype gene product remained nuclear. In case of the mutation p.I295 del-His the gene product of the wildtype was strongly attenuated and the protein remained cytoplasmic, whereas the mutant gene product was strongly overexpressed and located in the cytoplasm. These results may provide an explanation for the reduced penetrance shown by the mutations p.N99K and p.I295del. They also suggest that patients are affected due to haploinsufficiency.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cornea
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CO ₂	Kohlendioxid
'API	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendinitrotetraacetat
et al.	und Andere (et alii)
g	Gramm
GCL	Ganglion Cell Layer (Ganglienzellschicht)
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCl	Horizontalzellen
HRP	Horse Raddish Peroxidase
ILM	Innere Limitierende Membran (inner limiting membrane)

INL	Innere Kernschicht (inner nuclear layer)
IPL	Innere Plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
IS	Inneres Segment
KCL	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
L	Linse
M	Molar
MgCl_2	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MK	Monoklonal
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NR	Neuronale Retina
OLM	Outer limiting membrane (äußere limitierende Membran)
ON	Optischer Nerv
ONL	Outer nuclear layer (äußere Kernschicht)
OPL	Outer plexiform layer (äußere Faserschicht)
OS	Outer segment (Äußeres Segment)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	pons hydrogenium
PK	Polyklonal
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

TMD	Transmembrandomäne
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
Vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aufbau des menschlichen Auges und der Retina.	1
Abbildung 1-2: Darstellung des Augenhintergrundes durch eine Autofluoreszenz- und eine Fundusaufnahme eines Normprobanden.	2
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Ionen- und Nährstofftransportes im RPE.	4
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung eines EOG.	5
Abbildung 1-5: Funduskopische Abbildungen der verschiedenen Stadien der VMD.	7
Abbildung 1-6: Modell der Topologie von humanem Bestrophin 1.	10
Abbildung 2-1: Vektorkarte des pCR2.1®-TOPO-TA-Vektors.	22
Abbildung 2-2: Vektorkarte des pcDNA3.1 Vektor.	23
Abbildung 2-3: Vektorkarte des pcDNA5-FRT-Vektors.	24
Abbildung 2-4: Vektorkarte des pOG44- Plasmids.	25
Abbildung 2-5: Vektorkarte des pEGFP-N1-Vektors.	26
Abbildung 2-6 : Vektorkarte des pFRT_lac-Zeo-Vektors.	27
Abbildung 2-7: Aufbau einer Blottingapparatur.	48
Abbildung 3-1: Agarose-Gelelektrophorese des RT-PCR-Produktes hBEST1.	62
Abbildung 3-2: Vektorkarte des pT-BEST1-Vektors.	63
Abbildung 3-3: Verifikation isolierter pT-BEST1-Vektor-Klone mit der Restriktionsendonuklease EcoRI.	64
Abbildung 3-4: Vektorkarte des pT-BEST1 His (Insert rev)-Plasmids.	64
Abbildung 3-5: Vektorkarte des pC3(+)-BEST1-His-Vektors.	66
Abbildung 3-6: Verifikation isolierter pC3(+)-BEST1-His-Vektor-Klone mit der Restriktionsendonuklease HincII.	66
Abbildung 3-7: Agarose-Gelelektrophorese der Mutagenese-PCR-Produkte der Plasmid-DNA pC3(+)-BEST1-D312N-His, pC3(+)-BEST1-N99K-His und pC3(+)-BEST1-I295del-His.	67
Abbildung 3-8: Vektorkarte des <i>pC5-BEST1-Myc-FRT</i> -Vektors.	68
Abbildung 3-9: Verifikation der isolierten pC5-BEST1-Myc-FRT-Vektor-Klone mit der Restriktionsendonuklease BamHI.	69
Abbildung 3-10: Nachweis der Bestrophin 1-Expression in der humanen Retina mit einem N- und einem C-terminalen Antikörper.	70
Abbildung 3-11: Immunfluoreszenz von Bestrophin 1 in transient transfizierten MDCK-II-Zellen.	71
Abbildung 3-12: Western Blot-Experiment mit dem BEST1-N204-220 und dem Antikörper anti BEST1 (C-14).	72
Abbildung 3-13: Endogene Expression von <i>hBEST1</i> in MDCK-II-Zellen.	73
Abbildung 3-14 (vorherige Seite): Intrazelluläre Lokalisation des Bestrophin-1 mit E-Cadherin als Membranmarker.	75
Abbildung 3-15: Nachweis des Einbaus des BEST1-Myc-Konstruktes in das MDCK-II-Genom auf DNA Ebene.	78

Abbildung 3-16: Darstellung der stabilen Transfektion mittels Immunhistochemie und SDS-PAGE und Western Blot..... 80

Abbildung 3-17: Immunfärbung gegen den Myc-Tag des Wildtyp Bestrophin 1 in der stabil transfizierten MDCK-II-BEST-Zelllinie zur Darstellung der Interaktion mit den mutierten Proteinuntereinheiten. 82

Abbildung 3-18: Western Blot zum Nachweis des His-Tag-tragenden Bestrophin 1..... 83

Abbildung 3-19: Interaktion des stabil exprimierten Myc-Tag-markierten Wildtyp-Bestrophin 1 mit den transient exprimierten His-Tag-markierten Mutationen nach His-Tag-Affinitäts-Aufreinigung. 85

Abbildung 3-20: Nachweis des affinitätsgereinigten transient exprimierten His-Tag-markierten Bestrophin 1..... 86

Abbildung 3-21: Nachweis der Epithelialisierung von untransfizierten MDCK-Best-Zellen mit einem Myc-Tag-spezifischen Antikörper. 87

Abbildung 3-22 (vorherige Seite): Immunhistochemischer Nachweis des koexprimierten Bestrophin 1-Wildtyp und der Mutationen p.D312N, p.N99K und p.I295del..... 90

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 3: Chemikalien	17
Tabelle 4: Enzyme	19
Tabelle 5: Primer.....	20
Tabelle 6: Vektoren und Plasmide	21
Tabelle 7: Größenmarker	28
Tabelle 8: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und DNA-Farbstoffe.....	28
Tabelle 9: Lösungen und Puffer.....	29
Tabelle 10: Kits und Reagenziensysteme	32
Tabelle 11: Medium für die Zellkultur	33
Tabelle 12: Mediumzusätze für die Zellkultur	33
Tabelle 13: Vollmedium zur Kultivierung von adhärenen Zelllinien	33
Tabelle 14: Medium und Nährboden für die Bakterienkultur	33
Tabelle 15 : Verwendete Bakterienstämme.....	34
Tabelle 16: Verwendete Zelllinien	34
Tabelle 17: Polymerasespezifische Reaktionsbedingungen	40
Tabelle 18: Überblick über die Transfektionen verschiedener eukaryotischer Zelllinien	53
Tabelle 19: Transfektionsbedingungen.....	55
Tabelle 20: Antikörperkonzentrationen für die SDS- PAGE.....	57
Tabelle 21: Versuchsbedingungen für die eingesetzten Primärantikörper	59
Tabelle 22: Kolokalisationsanalyse des transient exprimierten Bestrophin 1 mit E-Cadherin in MDCK-II-Zellen.	74
Tabelle 23: Verhältnisse der eingesetzten Menge pOG44-Plasmid: pC5-BEST1-Myc-FRT-Plasmid.....	77
Tabelle 24: Kolokalisationsanalyse des transient exprimierten Bestrophin 1 mit dem stabil exprimierten Wildtyp in MDCK-II-Best-Zellen	90

10 Literaturverzeichnis

- AF, D. (1969). Electro-oculography in families with vitelliform dystrophy of the fovea. Detection of the carrier state. *Arch Ophthalmol*, 81(3), 305–16.
- Aldehni F, Spitzner M, Martins JR, Barro-Soria R, Schreiber R, K. K. (2009). Bestrophin 1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition of renal collecting duct cells.
- Arden, G. B., Barrada, A., & Kelsey, J. H. (1962). NEW CLINICAL TEST OF RETINAL FUNCTION BASED UPON THE STANDING POTENTIAL OF THE EYE. *The British Journal of Ophthalmology*, 46(8), 449–467.
- Baehr W, Wu SM, B. A. and P. K. (2003). The retinoid cycle and retinal disease. *Vision Research*, 43(28), 2957–2958.
- Balcarova-Ständer, J., Pfeiffer, S. E., Fuller, S. D., & Simons, K. (1984). Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. *The EMBO Journal*, 3(11), 2687–2694.
- Ban Y, R. (2000). Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Res*, 121, 89–95.
- Barro-Soria, R., Aldehni, F., Almaça, J., Witzgall, R., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2010). ER-localized bestrophin 1 activates Ca²⁺-dependent ion channels TMEM16A and SK4 possibly by acting as a counterion channel. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 459(3), 485–497.
- Barro-Soria R, Rainer Schreiber, K. K. (2008). Bestrophin 1 and 2 are components of the Ca activated Cl conductance in mouse airways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(10), 1993–2000.
- Best, F. (1905). Über eine hereditäre Maculaaffektion: Beiträge zur Vererbungslehre. *Z Augenheilkd*, 13, 199.
- Bitner, H., Mizrahi-Meissonnier, L., Griefner, G., Erdinest, I., Sharon, D., & Banin, E. (2011). A homozygous frameshift mutation in BEST1 causes the classical form of Best disease in an autosomal recessive mode. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(8), 5332–8.
- Blaug S, Quinn R, Quong J, Jalckee S, M. S. (2003). Retinal pigment epithelium function: a role for CFTR? *Doc Ophthlmol*, 106, 43–50.
- Bok D. (1993). The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*.

- Boon, C. J. F., Theelen, T., Hoefsloot, E. H., Van Schooneveld, M. J., Keunen, J. E. E., Cremers, F. P. M., ... Hoyng, C. B. (2009). Clinical and molecular genetic analysis of best vitelliform macular dystrophy. *Retina Philadelphia Pa*, 29(6), 835–847.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(4), 1604–1607.
- Bosl MR, Hubner C, Zdebik AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF, J. T. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl-channel disruption. *Curr Eye Res*, 20, 1289–99.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid And Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brown, M., Marmor, M., Vaegan, Zrenner, E., Brigell, M., & Bach, M. (2006). ISCEV Standard for Clinical Electro-oculography (EOG) 2006. *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 113(3), 205–212.
- Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, C. D. (2009). Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27, 2427–2434.
- Burgess, R., MacLaren, R. E., Davidson, A. E., Urquhart, J. E., Holder, G. E., Robson, A. G., Manson, F. D. C. (2009). ADVIRC is caused by distinct mutations in BEST1 that alter pre-mRNA splicing. *Journal of Medical Genetics*, 46(9), 620–625.
- Burgess, R., Millar, I. D., Leroy, B. P., Urquhart, J. E., Fearon, I. M., De Baere, E., ... Black, G. C. M. (2008). Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. *The American Journal of Human Genetics*, 82(1), 19–31.
- Davidson, A. E., Millar, I. D., Mullan, R. B., Maher, G. J., Urquhart, J. E., Brown, P. D., ... Manson, F. D. C. (2011). Functional characterisation of bestrophin-1 missense mutations associated with autosomal recessive bestrophinopathy (ARB). *IOVS*, 1–26.
- Davidson, A. E., Millar, I. D., Urquhart, J. E., Burgess-Mullan, R., Shweikh, Y., Parry, N., ... Manson, F. D. C. (2009). Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*, 85(5), 581–92.
- Doumanov, J. et al. (2013). Disease-Causing Mutations in BEST1 Gene Are Associated with Altered Sorting of Bestrophin-1 Protein. *Int.J.Mol. Sci*, 14, 15121–15140.
- Duta, V., Szkotak, A. J., Nahirney, D., & Duszyk, M. (2004). The role of bestrophin in airway epithelial ion transport. *{FEBS} Letters*, 577(3), 551–554.

- Gallemore, R. P., Hughes, B. A., & Miller, S. S. (1997). Retinal pigment epithelial transport mechanisms and their contributions to the electroretinogram. *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(4), 509–566.
- Gass, J. (1987). *Stereoscopic Atlas of Macular Diseases: Diagnosis and Treatment*. St. Louis, MO: Mosby.
- Gass, JMD. (1997). *Stereoscopic atlas of macular disease-diagnosis and treatment*.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, N. R. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5". *J.Gen.Virol.*, 36(1), 59–74.
- Guziewicz KE, Sinha D, Gomez NM, Zorych K, Dutrow EV, Dhingra A, Mullins RF, Stone EM, Gamm DM, B.-B. K. and A. G. (n.d.). Bestrophinopathy: An RPE-Photoreceptor Interface Disease.
- Hamann, S., Zeuthen, T., Cour, M. La, Nagelhus, E. A., Ottersen, O. P., Agre, P., & Nielsen, S. (1998). Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 274(5), C1332–C1345.
- Hartzell, H. C., Qu, Z., Yu, K., Xiao, Q., & Chien, L. (2008). Molecular Physiology of Bestrophins : Multifunctional Membrane Proteins Linked to Best Disease and Other Retinopathies. *Physiological Reviews*, 639–672.
- Hu JG, Gallemore RP, Bok D, Lee AY, F. DA. (1994). Localization of NaK ATPase on cultured human retinal pigment epithelium. *IOVS*, 35, 3582–3588.
- Johnson AA, Bachman LA, Gilles BJ, Cross SD, Stelzig KE, Resch ZT, Marmorstein LY, P. J. and M. A. (2015). Autosomal Recessive Bestrophinopathy Is Not Associated With the Loss of Bestrophin-1 Anion Channel Function in a Patient With a Novel BEST1 Mutation. *IOVS*, 56, 4619–4630.
- Johnson AA, Guziewicz KE, Lee CJ, Kalathur RC, Pulido JS, Marmorstein LY, M. A. (2017). Bestrophin 1 and retinal disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 58, 45–69.
- Johnson AA, Lee Y-S, Stanton JB, Yu K, Hartzell CH, M. L. and M. A. (2013). Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. *Human Molecular Genetics*, 22(23), 4688–4697.
- Kane Dickson V, Pedi L, L. S. (2014). Structure and insights into the function of a ca(2+)-activated Cl(-) channel. *Nature*, 516(7530), 213–218.
- Kinnick, T. R., Mullins, R. F., Dev, S., Leys, M., Mackey, D. A., Kay, C. N., Stone, E. M. (2011). Autosomal recessive vitelliform macular dystrophy in a large cohort of vitelliform macular dystrophy patients. *Retina Philadelphia Pa*, 31(3), 581–595.

- Krämer, F., White, K., Pauleikhoff, D., Gehrig, A., Passmore, L., Rivera, a, Weber, B. H. (2000). Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 8(4), 286–92.
- La Cour, M C. (1991). pH homeostasis in the frog retina: the role of Na⁺:Hco₃⁻ co-transporter in the retinal pigment epithelium. *Acta Ophthalmol*, 69, 496–504.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227(5259), 680–685.
- LaVail, M. (1983). Outer segment disc shedding and phagocytosis in the outer retina. *Transactions of the Ophthalmological Societies of the*
- Lottspeich F, J. E. (2006). *Bioanalytik*. Elsevier, Spektrum Akad. Verlag.
- Marmorstein LY, Precious J. McLaughlin, J. Brett Stanton, Lin Yan, J. W. C. and A. D. M. (2002). Bestrophin Interacts Physically and Functionally with Proetin Phosphatase 2A.
- Marmorstein, A D., Marmorstein, L. Y., Rayborn, M., Wang, X., Hollyfield, J. G., & Petrukhin, K. (2000). Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12758–63.
- Marmorstein, A. D., & Marmorstein, L. Y. (2007). The challenge of modeling macular degeneration in mice. *Trends in Genetics*, 23(5), 225–231.
- Marmorstein AD, Johnson AA, Bachman LA, Andrews-Pfannkoch C, Knudsen T, Gilles BJ, Hill M, Gandhi JK, M. L. & P. J. (2018). Mutant Best1 Expression and Impaired Phagocytosis in an iPSC Model of Autosomal Recessive Bestrophinopathy. *Nature Scientific Reports*, 8, 4487.
- Marmorstein AD, Kinnick TR, Stanton JB, Johnson AA, Lynch RM, M. L. (2015). Bestrophin - 1 influences transepithelial electrical properties and Ca signaling in human retinal pigment epithelium. *Molvis*, 21, 347–359.
- Marmorstein, L. Y., Wu, J., McLaughlin, P., Yocom, J., Karl, M. O., Neussert, R., ... Marmorstein, A. D. (2006). The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1). *The Journal of General Physiology*, 127(5), 577–89.

- Marquardt, A., Stöhr, H., Passmore, L. A., Krämer, F., Rivera, A., & Weber, B. H. F. (1998). Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Biochemistry*, 7(9), 1517–1525.
- Milenkovic, A., Brandl, C., A. B., Milenkovic, V. M., C., ... and Bernhard H. F. Weber. (2015). Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *PNAS*, E2630–E2639.
- Milenkovic, V. M., Krejcova, S., Reichhart, N., Wagner, A., & Strauss, O. (2011). Interaction of bestrophin-1 and Ca²⁺ channel β -subunits: identification of new binding domains on the bestrophin-1 C-terminus. *PloS One*, 6(4), e19364. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019364>
- Milenkovic, V. M., Rivera, A., Horling, F., & Weber, B. H. F. (2007). Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1313–21. <http://doi.org/10.1074/jbc.M607383200>
- Milenkovic VM, Röhrl E, Weber BF, S. O. (2011). Disease-associated missense mutations in bestrophin-1 affect cellular trafficking and anion conductance. *J Cell Sci*, 124(17), 2988–2996.
- Miller SS, E. J. (1991). Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol*, 424, 283–300.
- Nguyen-Legros J, H. D. (2000). Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium.
- Pasquay C1, Wang LF, Lorenz B, P. M. (2013). Bestrophin 1--Phenotypes and Functional Aspects in Bestrophinopathies. *Ophthalmic Genet.*, 36(3), 193–212.
- Pollack K, Kreuz FR, P. LE. (2005). [Best's disease with normal EOG. Case report of familial macular dystrophy]. *Ophthalmologie*, 102(9), 891–4.
- Qu Z, Wei RW, Mann W, H. H. (2003). Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca(2+)-activated Cl(-) currents. *J. Biol. Chem.*, 278, 49563–49572.
- Qu, Z., Chien, L.-T., Cui, Y., & Hartzell, H. C. (2006). The anion-selective pore of the bestrophins, a family of chloride channels associated with retinal degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(20), 5411–9. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5500-05.2006>
- Qu, Z., & Hartzell, C. (2004). Determinants of Anion Permeation in the Second Transmembrane Domain of the Mouse Bestrophin-2 Chloride Channel. *The Journal of General Physiology*, 124(4), 371–382.

- Reichhart N., Milenkovic V. M., Halsband C.-A., Cordeiro, S., & Strauss, O. (2010). Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel beta-subunit. *Experimental Eye Research*, 91(5), 630–639.
- Shawky RM. (2014). Reduced penetrance in human inherited disease. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 15, 103–111.
- Schwegler, J. S. (1998). *Der Mensch-Anatomie und Physiologie* (2.). Thieme Verlag.
- Seyffert W. (2003). *Seyffert Lehrbuch der Genetik* (2.Auflage). Berlin.
- Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, G. D. (2013). iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet*, 22(3), 593–607.
- Spitzner M, Martins JR, Soria RB, Ousingsawat J, Scheidt K, Schreiber R, K. K. (2008). Eag1 and Bestrophin 1 are up-regulated in fast-growing colonic cancer cells.
- Stanton, J. B., Golgberg, A. F. X., Hoppe, G., Marmorstein, L. Y., & Lihua Y. Marmorstein, Precious J. McLaughlin, J. Brett Stanton, Lin Yan, J. W. C. and A. D. M. (2006). Hydrodynamic properties of porcine bestrophin-1 in Triton X-100. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1758(2), 241–247.
- Steinberg RH, Linsenmeier RA, G. E. (2003). Three light-evoked responses of retinal pigment epithelium. *Vision Res*, 23, 1315–23.
- Stöhr H, Marquardt A, Nanda I, Schmid M, W. B. (2002). Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. *Eur J Hum Genet*.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85(3), 845–81.
- Strauss, O., Neussert, R., Müller, C., & Milenkovic, V. M. (2012). A potential cytosolic function of bestrophin-1. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 723, 603–10.
- Sun, H., Tsunenari, T., Yau, K.-W., & Nathans, J. (2002). 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(6), 4008–4013.
- Tsunenari, T., Sun, H., Williams, J., Cahill, H., Smallwood, P., Yau, K.-W., & Nathans, J. (2003). Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41114–25.

- Uggenti C, Briant K, Streit A-K, Thomson S, Koay YH, Baines RA, Swanton E, M. F. (2016). Restoration of mutant bestrophin-1 expression, localisation and function in a polarised epithelial cell model. *Disease Models & Mechanisms*, 1317–1328.
- Vaisey G, Miller AN, L. S. (2016). Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the bestrophin ion channel. *PNAS*, E7399–E7408.
- Vaisey G, M. A. and L. S. (2016). Distinct regions that control ion selectivity and calcium-dependent activation in the bestrophin ion channel. *PNAS*, E7399–E7408.
- Wabbels, B., Preising, M. N., Kretschmann, U., Demmler, A., & Lorenz, B. (2006). Genotype-phenotype correlation and longitudinal course in ten families with Best vitelliform macular dystrophy. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244(11), 1453–1466.
- Weng J, et al. (1999). Insights into the function of rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knock out mice. *Cell*, 98(1), 13–23.
- Xiao, Q., Hartzell, H. C., & Yu, K. (2010). Bestrophins and retinopathies. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 460(2), 559–569.
- Yang et al. (2014). Structure and selectivity in bestrophin ion channels. *Science*, 346(6207), 355–359.
- Yardley, J., Leroy, B. P., Hart-Holden, N., Lafaut, B. a, Loeys, B., Messiaen, L. M., ... Black, G. C. M. (2004). Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(10), 3683–9.
- Yu, K., Qu, Z., Cui, Y., & Hartzell, H. C. (2007). Chloride channel activity of bestrophin mutants associated with mild or late-onset macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(10), 4694–705.
- Zhang Y, Patil RV, M. A. (2010). Bestrophin 2 is expressed in human non-pigmented ciliary epithelium but not retinal pigment epithelium. *Molvis*, 16, 200–206.

11 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei PD Dr. Markus Preising für die Überlassung des Themas und die Betreuung des Projektes. Des Weiteren danke ich Ihm für das Korrekturlesen der fertigen Arbeit.

Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ich danke der Dr. Gertrud und Franz-Karl Portmann-Stiftung für die Finanzierung des Projektes.

Mein besonderer Dank gilt Frau Annabella Janise, die mich in all den Jahren nicht nur durch ihr enormes Fachwissen, sondern auch ganz besonders aufgrund ihrer stets hilfsbereiten Art unterstützt hat.

Ein großer Dank auch an Herrn Tobias Wimmer für die geduldige Einarbeitung in die Labormethoden.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Ophthalmologie für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft, den Erfahrungsaustausch und die vielen wertvollen Anregungen und konstruktiven Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich moralisch und finanziell unterstützt hat, was die Finalisierung des Projektes überhaupt erst ermöglicht hat!

Ein weiteres dickes Dankeschön geht an meinen Verlobten, der mich ebenfalls moralisch und finanziell unterstützt hat und mir bei der technischen Umsetzung der Arbeit assistiert hat.

12 Eidesstattliche Erklärung

„ Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „ Satzung der Justus Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatssoftware bzw. ein Internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden“