Ftm reguliert die Transitionszonen-Integrität und proteasomale Aktivität in primären Zilien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Johanna Maria Lier
aus Laurahütte

Düsseldorf, Oktober 2012

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: **Univ.-Prof. Dr. U. Rüther**
Korreferent: **Univ.-Prof. Dr. T. Klein**

Tag der mündlichen Prüfung: **12.12.2012**

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 7

1.1 Entwicklungsbiologische Grundlagen 7

1.2 Die *Ftm*-Mausmutante 10

1.3 Die Architektur der Zilie 11
1.3.1 Der Basalkörper 13
1.3.2 Das Axonem 14
1.3.3 Die Transitionszone 15
1.3.3.1 Das Nphp1-4-8-Modul 17
1.3.3.2 Das Nphp5-6-Modul 19
1.3.3.3 Das Mks/B9-Modul 19
1.3.3.4 Das Inversin-Kompartiment 20

1.4 Ziliopathien 20

1.5 Der Zilien-Zentriolen-Zentrosomen-Zyklus 22

1.6 Der Intraflagellar-Transport 25

1.7 Extraziliäre Transport-Mechanismen 28
1.7.1 Extraziliärer Transport Membran-gebundener Proteine 28
1.7.2 Extraziliärer Transport löslicher Proteine 31

1.8 Diffusionsbarrieren an der Basis von Zilien 31

1.9 Der Zilien-assoziierte Shh-Signalweg 34

1.10 Mechanismen des Proteinabbaus 38
1.10.1 Der Proteasom-Aufbau 39
1.10.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System 41

1.11 Ziel dieser Arbeit 44

2 MATERIAL UND METHODEN 45

2.1 Tierexperimente 45
2.1.1 Tierhaltung 45
2.1.2 Isolation definierter Embryonalstadien 45
2.1.3 Genotypisierung von Embryonen 46

2.2 Zellkulturtechniken 46
2.2.1 Primärzellkulturen und Zelllinien 46
2.2.1.1 Isolation und Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten 46
2.2.1.2 Zelllinien 47
2.2.2 Passagieren von Zellen 47
2.2.3 Behandlung von MEFs mit MG132 48
2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen 48
2.2.5 Kultivierung von Zellen auf Deckgläschen 49
2.2.6 Bestimmung der Zelldichte 49
2.2.7 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen 50

2.3 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren 50
2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA 50
2.3.1.1 Plasmid-Mini-Isolation 50
2.3.1.2 Plasmid-Midi/Maxi-Isolation 52

2.3.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Dottersäcken von Mausembryonen 53
2.3.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwänzen von Mausembryonen 55
2.3.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwanzspitzen adulter Mäuse 56
2.3.5 RNA-Isolierung aus Gliedmaßen von Mausembryonen 56
2.3.6 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 57
2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 58
2.3.8 Die PCR-Amplifikation 58
2.3.9 Verwendete Plasmidvektoren und Oligonukleotide 60
2.3.10 Reverse Transkription 61
2.3.11 Real-time-PCR-Untersuchungen 61

2.4 Klonierungstechniken 62
2.4.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen 62
2.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen 63
2.4.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 64
2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten 65
2.4.5 DNA-Sequenzierung 65
2.4.6 Transformation von Plasmiden in Bakterien 65
2.4.6.1 Herstellung kompetenter Bakterien 65
2.4.6.2 Transformation 66

2.5 Immunofluoreszenzanalysen 67
2.5.1 Anfertigung von Gefrierdünnschnitten 67
2.5.1.1 Präparation, Fixierung und Einbettung von Embryonen 67
2.5.1.2 Anfertigung von Gefrierdünnschnitten 67
2.5.2 Immunofluoreszenzfärbungen 68
2.5.2.1 Immunofluoreszenzfärbung auf Gefrierdünnschnitten 68
2.5.2.2 Immunofluoreszenzfärbung von Zellen 69

2.6 Proteinbiochemie 72
2.6.1 Aufreinigung von Proteinkomplexen 72
2.6.1.1 Vorbereitungen der Zellen 72
2.6.1.2 Koimmunopräzipitation 72
2.6.1.3 Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP) 74
2.6.2 Western Blot-Analysen 76
2.6.2.1 Proteinextraktion aus Gliedmaßen 76
2.6.2.2 Proteinextraktion aus Zellen 77
2.6.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 77
2.6.4 Silbergelfärbung von Polyacrylamidgelen 78
2.6.5 Proteintransfer („Blotten“) 79
2.6.6 Immunonachweis von Proteinen 80
2.6.7 Quantifizierung der Proteindaten 81

2.7 Fotodokumentation und Bildbearbeitung 81

2.8 Statistik 81

3 ERGEBNISSE 83

3.1 Ftm ist in der TZ von MEFs lokalisiert 83

3.2 Der Verlust von Ftm führt zu einer verminderten TZ-Lokalisierung zahlreicher Nphp-Proteine 85

3.3 Das Mks/B9-Modul wird unabhängig von Ftm organisiert 89

3.4 Die Proteinmenge des Ftm-verwandten Rpgrip1 ist in Abwesenheit von Ftm erhöht 91

3.5 *Ftm*-negative MEFs weisen eine gestörte Zilienanzahl und -morphologie auf 93

3.6 Reduzierte Lokalisierung Membran- und BBSom-assoziierter Proteine in *Ftm*-negativen Zilien 95

3.7 Ftm interagiert mit Psmd2, einer Komponente der 19S-Untereinheit des Proteasoms 97

3.8 Anreicherung von Proteasomsubstraten in *Ftm*-defizienten Zilien 100

3.9 Parallelen zwischen proteasominhibierten Zellen und *Ftm*$^{-/-}$-MEFs 105

4 DISKUSSION 110

4.1 Die TZ-Verankerung von Ftm wird durch CC-Domänen realisiert 110

4.2 Ftm vermittelt die TZ-Lokalisierung der Nphp-Module 111

4.3 Ftm ist nicht für die TZ-Lokalisierung des Mks/B9-Moduls verantwortlich 116

4.4 Cspp1, Sept2 und Nukleoporine sind Kandidaten für eine Ftm-übergeordnete Position in der TZ-Assemblierungshierarchie 117

4.5 Ftm kontrolliert die Proteinkomposition von Zilien in MEFs 119

4.6 Ftm reguliert das ziliäre Proteasom über die Interaktion mit Psmd2 122

4.7 *Ftm*$^{-/-}$-MEFs phänokopieren proteasominhibierte Zellen 125

4.8 Ftm im Kontext des PCP-Signalwegs 127

4.9 Wie könnte Ftm die proteasomale Aktivität an der Basis der Zilie regulieren? 128

4.10 Die *FTM*-Mutation als Ursache für Ziliopathien und Tumore 129

5 AUSBLICK 131

5.1 Ist die vierte CC-Domäne für die TZ-Lokalisierung von Ftm verantwortlich? 131

5.2 Übt Rpgrip1 eine zu Ftm redundante Funktion aus? 132

5.3 Welche Position bekleidet Cep290 in der TZ-Assemblierungshierarchie? 132

5.4 Organisiert Ftm das Mks/B9-Modul? 133

5.5 Stehen Cspp1, Sept2 oder Nukleoporine über Ftm in der TZ-Assemblierungshierarchie? ... 133

5.6 Welche weiteren Folgen hat die verminderte TZ-Integrität in *Ftm*-negativen Zilien und wie könnten diese behoben werden? 134

5.7 Wie kann bewiesen werden, dass Ftm die proteasomale Aktivität an der Basis der Zilie reguliert? 135

6 ZUSAMMENFASSUNG 137

7 ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN 139

8 ANHANG 144

9 LITERATUR 150

10 DANKSAGUNG 178

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 179

1 EINLEITUNG

1.1 Entwicklungsbiologische Grundlagen

Wissenschaft, die sich mit der Entwicklung eines multizellulären Organismus beschäftigt, wird zusammenfassend als Entwicklungsbiologie bezeichnet. Ihr Ziel ist das Verständnis von molekulargenetischen und entwicklungsphysiologischen Prozessen, die in einem Organismus ab der befruchteten Eizelle (Zygote) bis zum Tod realisiert werden. Ein Teilgebiet der Entwicklungsbiologie stellt die so genannte „Embryologie“, also die Lehre von der Entwicklung des Embryos, dar. Während der Embryonalentwicklung entstehen aus einer einzelnen Zelle, der Zygote, Billionen von Zellen, die in spezialisierten Geweben und Organen organisiert werden. Die Zellen durchlaufen dabei einen Prozess von progressiven Veränderungen, die zur Zunahme der Komplexität führen. Dieser Prozess kann grob in drei Abschnitte unterteilt werden: Zellteilung, Differenzierung und Morphogenese (Campbell, 2000). Zunächst kommt es zu einer Reihe von schnellen, mitotischen Teilungen der befruchteten Eizelle, um eine rasche Erhöhung der Zellzahl zu erzielen. Weiterhin müssen die gebildeten Zellen differenzieren, ein Vorgang, der die Morphologie und Funktion wesentlich verändert. Da jede Zelle eines Organismus das gleiche genetische Material erbt, muss es einen Mechanismus geben, der die Generierung diverser Zelltypen instruiert. Dieser Mechanismus wird durch die selektive und differentielle Genexpression realisiert und bezeichnet die kontrollierte Veränderung des Genexpressionsmusters einer Zelle. Der Vorgang der differenziellen Genexpression kann auf verschiedenen Stufen reguliert werden. (1) Eine Zelle kann die Transkription von Genen kontrollieren (Transkriptionskontrolle). (2) Das primäre RNA-Transkript kann unterschiedlich modifiziert oder gespleißt werden (RNA-Prozessierungskontrolle). (3) Es kann kontrolliert werden, welche mRNA ins Zytoplasma transportiert werden darf und was ihr Ziel-Kompartiment ist (mRNA-Transport- und Lokalisierungskontrolle). (4) Der Zeitpunkt der Translation einer mRNA kann reguliert werden (Translationskontrolle). (5) Die Halbwertszeit von mRNAs kann festgesetzt werden (mRNA-Abbaukontrolle). (6) Synthetisierte Proteine können reguliert werden, indem man ihren Aufenthaltsort, ihre Aktivität oder ihren Abbau kontrolliert (Proteinaktivitätskontrolle) (Alberts *et al.*, 2004). Da die Morphologie und Funktion eines Zelltyps durch die in ihm vorhandenen Proteine bestimmt wird, tragen alle Kontrollmechanismen dazu bei, dass Zellen durch Gene, die für Proteine kodieren, wiederum die Aktivität anderer Gene regulieren und koordinieren können. Eine Zelle kann die Expression ihrer Gene aber auch als Reaktion auf äußere

Einflüsse verändern. Beispielsweise finden lokale Wechselwirkungen zwischen Zellen statt, die das Differenzierungsschicksal mitbestimmen. Die interzelluläre Kommunikation kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: Wenn Zellmembranproteine auf der Oberfläche einer Zelle mit Rezeptoren auf einer benachbarten Zelle interagieren, dann spricht man von „juxtakrinen" Interaktionen. Werden Signalproteine von einer Zelle sezerniert und wirken über eine räumliche Distanz hinweg auf entfernte Zellen, dann wird diese Übertragung als „parakrin" bezeichnet. Das Signalmolekül, auch „Morphogen" genannt, bildet einen stofflichen Gradienten aus, der Zellen Positions- und Identitätsinformationen signalisieren kann (Turing, 1952). Eine Vielzahl von parakrinen Faktoren können aufgrund ihrer biochemischen Struktur in eine von vier Proteinfamilien gegliedert werden: die Hh-Genfamilie (engl. hedgehog), die TGFβ/BMP-Superfamilie (engl. transforming growth factor β, bone morphogenetic proteins), die FGF-Familie (engl. fibroblast growth factors) und die Wnt- oder Wingless-Familie (Gerhart, 1999; Gilbert, 2000). Parakrine Faktoren binden an Rezeptoren und initiieren eine Serie von enzymatischen Reaktionen innerhalb einer Zelle, die man als „Signaltransduktionskaskade" bezeichnet (Rodbell, 1980). Ihr Ziel ist die Regulation von Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Aktivität anderer Gene beeinflussen.

Der Prozess, der Zellen zu Geweben und zu komplexen dreidimensionalen Organen ausbildet, wird als Gestaltbildung oder „Morphogenese" bezeichnet. Ein Schlüsselelement der Morphogenese ist die Musterbildung. Die Musterbildung beginnt mit der Definierung der drei Polaritätsachsen: der anterior-posterior Achse (vom Kopf bis zum Schwanz), der dorso-ventralen Achse (vom Rücken zum Bauch) und der Links-Rechts-Achse. Sie endet mit der Ausformung von Körperelementen wie dem Kopf, Thorax oder Abdomen (Lodish *et al.*, 2001). Weiterhin reguliert die Musterbildung auch alle Morphologieänderungen und Wanderungen einer Zelle, die sie benötigt, um innerhalb des Organs die richtige Position einzunehmen. Die molekularen Faktoren, die die Musterbildung steuern, werden auf zellulärer Ebene als Positionsinformation in die Zelle geleitet und über die Expression so genannter „Musterbildungsgene" kontrolliert. Das Besondere an Musterbildungsgenen ist, dass sie evolutionär hoch konserviert in vielen verschiedenen Tieren vorkommen; von der Fliege bis zum Säugetier (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980).

Das heutige Wissen über entwicklungsbiologische Vorgänge beruht größtenteils auf der Untersuchung von Modellorganismen. Die Funktion eines Mechanismus kann am einfachsten erforscht werden, indem man diesen stört und seine Funktion aus den Auswirkungen der Störung ableitet. Da sich Untersuchungen an menschlichen Genen mit

Hilfe von Mutationen aus ethischen, aber auch aus experimentellen Gründen nicht einfach durchführen lassen, bedient sich der Mensch evolutionär tiefer stehender Organismen, wie der Grünalge (*Chlamydomonas reinhardtii*), der Taufliege (*Drosophila melanogaster*), dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), dem Zebrabärbling (*Danio rerio*), dem Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) und vor allem der Hausmaus (*Mus musculus*). Trotz der Vielfalt aller Lebewesen sind multiple molekulare Grundlagen und Basisprozesse hoch konserviert und ein sehr großer Teil der menschlichen Gene findet sich in homologen Formen wieder. Durch systematische Genom- und Proteinanalysen lassen sich Rückschlüsse von Modellorganismen auf den Menschen ziehen. Daher besteht Interesse daran, gentechnisch veränderte Lebewesen zu generieren, die mutierte Gene exprimieren und auch an ihre Nachkommen weitergeben. Eine Methode, um mutierte Gene in Mauszellen einzuschleusen, ist das „gene-targeting". Dabei wird das mutierte Gen mittels homologer Rekombination ins Genom aufgenommen und ersetzt das wildtypische Gen (Capecchi, 1989). Im Optimalfall wird dadurch die Funktion des ursprünglichen Gens komplett aufgehoben; die Mäuse werden dann als „Geninaktivierungs"-Mäuse bezeichnet. Alternativ kann die Aktivität eines Gens auch konditional abgeschaltet werden, also zu einem bestimmten Zeitpunkt und/oder in einem bestimmten Gewebe. Auch die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) hat sich in vielen Organismen und Zelllinien bewehrt. Durch die Insertion von siRNAs (small interfering RNA) kommt es zu einer Degradierung bzw. zu einer Translationshemmung der Ziel-mRNA (Fraser *et al.*, 2000; Misquitta und Paterson, 1999; Wianny und Zernicka-Goetz, 2000).

Die Wahl des Modellorganismus wird durch die biologische Fragestellung beeinflusst, welche sich oft mit biochemischen Grundlagen zahlreicher humaner Krankheiten befasst. Auf dem Gebiet der Ziliopathien (Funktionsstörung von Zilien, die zu humanen Krankheiten führen, siehe Abschnitt 1.4) beispielsweise eignet sich nicht jeder Modellorganismus gleich gut. Obwohl *C. elegans* zwar Zilien besitzt, kann die Dysfunktion dieser jedoch keine humanen Krankheitsmodelle imitieren, da die betroffenen Tiere keine vergleichbaren phänotypischen Defizite zeigen. Daher finden sich zwar teilweise menschliche Homologe im Genom des Fadenwurms wieder, doch sind die Funktionen der entsprechenden Proteine unterschiedlich (Chih *et al.*, 2011). Auf dem Gebiet humaner Krankheitsmodelle, auch im Bereich der Ziliopathien, etablierte sich dagegen die Hausmaus, deren anatomische und physiologische Konstitution am ehesten mit der des Menschen vergleichbar ist. Diese Doktorarbeit basiert auf der Analyse einer

Geninaktivierungs-Maus, der *Ftm*-Mutante, mit deren Hilfe die Funktion des Ftm-Proteins näher charakterisiert werden soll.

1.2 Die *Ftm*-Mausmutante

Ftm (Fantom; Rpgrip1l) wurde erstmalig als eines von sechs Genen identifiziert, die in der *Ft (Fused-toes)*-Mausmutante deletiert sind (Peters *et al.*, 2002). Das Gen liegt auf dem achten Mauschromosom und setzt sich aus 25 Exons zusammen, die sich über einen DNA-Bereich von 100kB Länge erstrecken. Das murine Ftm besteht aus 1264 Aminosäuren, die mehrere funktionelle Protein-Protein-Interaktionsdomänen enthalten. N-terminal befinden sich fünf Coiled-coil-Domänen, die die potentielle Bildung von Homopolymeren fördern (Zhao *et al.*, 2003). In C-terminaler Richtung schließen sich zwei C2-Domänen an, die in mögliche Phospholipid-Interaktionen involviert sind (Azzi *et al.*, 1992). Das Protein wird durch eine RID-Domäne (RPGR Interacting Domain) C-terminiert, die eine starke Sequenzhomologie zum Ftm-verwandten Rpgrip1-Protein (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein1) aufzeigt (Boylan und Wright, 2000; Hong *et al.*, 2001). In Rpgrip1 sorgt die RID-Domäne für die Interaktion mit Rpgr (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator) (Hong *et al.*, 2001). Durch vergleichende *in silico*-Analysen konnte demonstriert werden, dass *Ftm* ein evolutionär hoch konserviertes Gen darstellt. In der Geschichte der Vertebraten-Entwicklung führte seine Duplikation zu der Entstehung des verwandten Rpgrip1-Proteins (unpublizierte Daten Renate Dildrop) (Vierkotten *et al.*, 2007). Daher findet man *Ftm*-Orthologe im Stamm der Nesseltiere (*Cnidaria*) bis hin zu den Säugetieren (*Mammalia*), während Rpgrip1 lediglich in den Säugetieren vertreten ist (Vierkotten *et al.*, 2007).

Um die Funktion von Ftm zu untersuchen, wurde eine *Ftm*-Mausmutante generiert und die Auswirkungen des Proteinverlustes analysiert (Vierkotten *et al.*, 2007). Ftm lokalisiert in der G_1- oder G_0-Phase des Zellzyklus am Basalkörper von Zilien. In sich teilenden Zellen liegt das Protein mit den Zentrosomen assoziiert vor (Lier, 2008; Vierkotten *et al.*, 2007). *Ftm*-defiziente Mäuse zeigen eine variable Penetranz in Defekten, die auf eine Dysfunktion von Zilien und eine damit einhergehende Störung von Signalwegen zurückzuführen sind (Gerhardt, 2010; Vierkotten *et al.*, 2007). Betroffene Mäuse leiden an einer Links-Rechts-Asymmetrie, Polydaktylie der Vorder- und Hintergliedmaßen, Exenzephalie, Mikrophthalmie, kraniofaziale Störungen, Dorsalisierung des Neuralrohrs, Lungen-, Leber- und Herzdefekten sowie Nierenzysten und sind spätestens perinatal letal (Delous *et*

al., 2007; Gerhardt, 2006, 2010; Vierkotten, 2006; Vierkotten *et al.*, 2007). *Ftm*-heterozygot mutante Wurfgeschwister weisen dagegen keinerlei Defekte auf, sie sind postnatal lebensfähig und fertil (Vierkotten *et al.*, 2007).

1.3 Die Architektur der Zilie

Die erste Publikation über Zilien wurde bereits um 1835 von den Biologen Purkinje und Valentin verfasst (Purkinje und Valentin, 1835). Sie beschrieben die motilen Zilien in der Trachea von Vertebraten und erkannten, dass diese für den Mukustransport verantwortlich sind. Es folgten jedoch 150 Jahre, in denen Zilien zu verkümmerten Rudimenten ohne jegliche Funktion für Zellen degradiert wurden. Die biologische Wichtigkeit der Zilie wurde erst im Jahr 1976 erkannt, als man herausfand, dass die Dysfunktion von Zilien eine Ursache für menschliche Syndrome darstellt (Afzelius, 1976). Durch diese Entdeckung steht das kleine Organell bis heute im Fokus zahlreicher biologischer und medizinischer Disziplinen, deren Aufgabe es ist, die physiologische Funktion und Biogenese der Zilien zu erforschen. Heutzutage ist bekannt, dass Zilien eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen innehaben: Sie kontrollieren das Wachstum, die Differenzierung und die Migration von Zellen und sind somit von essentieller Bedeutung für die Embryonalentwicklung und Homöostasis eines Organismus (Gerdes *et al.*, 2009; Plotnikova *et al.*, 2008). Die immer weiter expandierende Palette der Zilienfunktionen geht mit einem expandierenden Wissen über die Zilienstruktur und ihre Proteinkomposition einher. Vergleichende, proteomische Analysen der Zilien von Vertebraten und Invertebraten führten mittlerweile zu der Erkenntnis, dass ein Repertoire von über 1000 Proteinen benötigt wird, um den Aufbau und Erhalt von Zilien zu ermöglichen (Gherman *et al.*, 2006). Zilien sind hoch konservierte Organellen, die man von den Protozoen bis hin zu den Säugetieren findet (Carvalho-Santos *et al.*, 2011). Sie werden konventionell in zwei unterschiedliche Kategorien eingeteilt: primäre und motile Zilien. Ein einzelnes, primäres Zilium von ca. 1-30 µm Länge befindet sich auf der apikalen Oberfläche der meisten eukaryotischen Zellen (Besschetnova *et al.*, 2010; McGlashan *et al.*, 2010; Wheatley, 2005). Primäre Zilien sind immotil und fungieren als Zellantennen, die physikalische und biochemische extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Geruchsstoffe und Morphogene aus dem Umfeld aufnehmen und in intrazelluläre Signalkaskaden transduzieren (Berbari *et al.*, 2009; Singla und Reiter, 2006). Zahlreiche motile Zilien befinden sich auf der Oberfläche von Epithelzellen, beispielsweise in der Trachea oder

dem Ovidukt. Dort schlagen sie in kooperativen, wellenförmigen Bewegungen und erzeugen einen Flüssigkeitsstrom der darin enthaltene Moleküle transportiert. Weiterhin werden Zilien von vielen Protisten zur Fortbewegung genutzt (Vincensini *et al.*, 2011).

Unser heutiges Wissen über die Architektur von Zilien basiert größtenteils auf den Ergebnissen von elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die eine Unterteilung der Zilie in drei Hauptkompartimente ermöglichen: den Basalkörper, das Axonem und die Transitionszone (Abbildung 1.1).

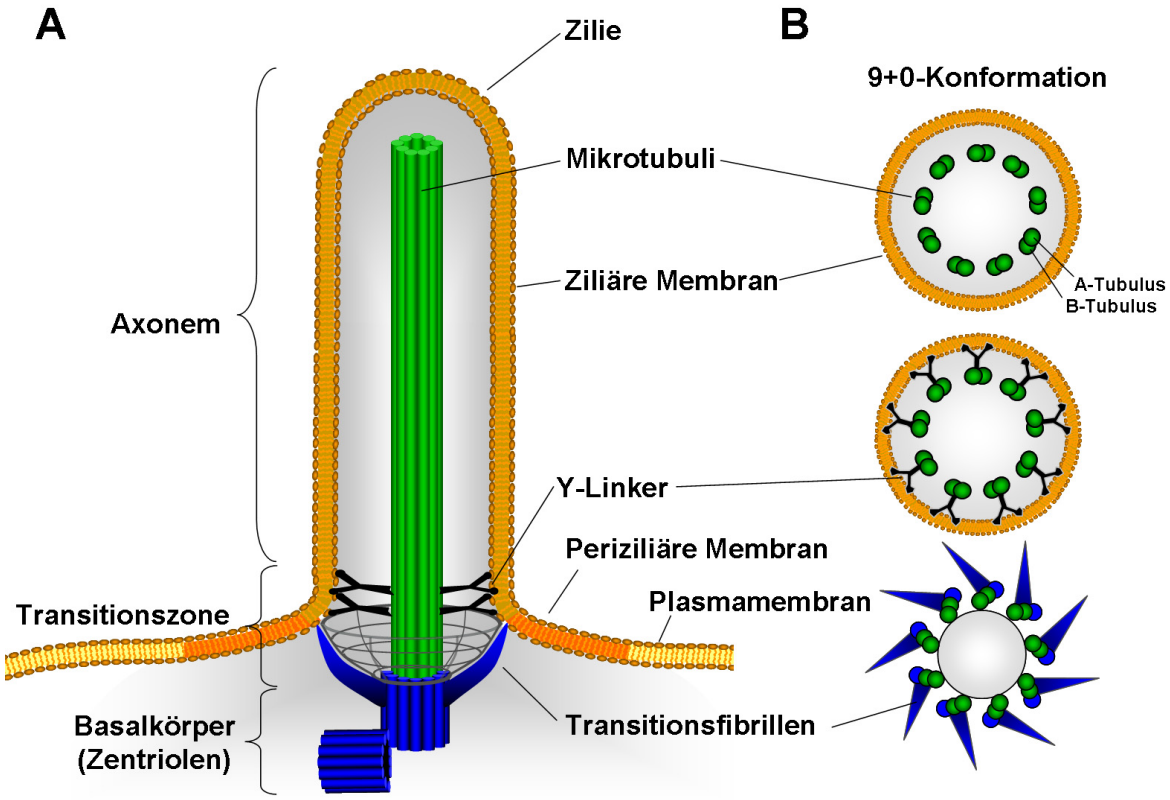

Abbildung 1.1: Architektur einer Zilie.

(A) Schematische Darstellung des Aufbaus einer primären Zilie. Die Zilie ist durch die Transitionsfibrillen des Basalkörpers (Mutterzentriole) an der Plasmamembran der Zelle verankert. Der Bereich distal der Transitionsfibrillen wird als Transitionszone (TZ) bezeichnet und ist durch Y-Verbindungen gekennzeichnet. Das Axonem besteht aus Mikrotubuli und wird von einer speziellen, ziliären Membran umgeben. (B) Querschnitte durch den Basalkörper, die TZ und das Axonem einer primären Zilie. Das Axonem weist im Inneren eine „9+0"-Duplett-Mikrotubuli-Konformation auf, die aus den neun radiärsymmetrisch angeordneten Triplett-Mikrotubuli des Basalkörpers hervorgeht.

1.3.1 Der Basalkörper

Die primäre Zilie befindet sich an der Oberfläche der meisten Vertebratenzelltypen und wird durch den Basalkörper in der Zelle verankert. Unter dem Basalkörper versteht man ein, an die Plasmamembran einer Zelle angedocktes, Zentriolenpaar (Henneguy, 1898; Lenhossek, 1898). Das Paar wird durch die Mutterzentriole (auch maternale Zentriole genannt) und eine, auf ihr orthogonal liegende, Tochterzentriole gebildet (Tassin und Bornens, 1999). Zentriolen sind tonnenförmige Gebilde mit einem Durchmesser von ca. 250 nm. Sie bestehen aus einer radiärsymmetrischen Anordnung von neun Triplett-Mikrotubuli-Strängen, die man kurz auch als „9x3"-Konformation bezeichnet (Gibbons und Grimstone, 1960). Dabei wird ein Triplett von jeweils einem A-, B- und C-Mikrotubulus gebildet. Der Mikrotubulus selbst ist aus Protofilamenten aufgebaut, die sich wiederum aus heterodimeren α- und β-Tubulin-Untereinheiten zusammensetzen (Nogales *et al.*, 1998; Song und Mandelkow, 1993). Die Triplett-Mikrotubuli-Struktur der Mutterzentriole dient als Matrize für den Aufbau des ziliären Axonems. In der Interphase des Zellzyklus wird das Mikrotubuli-Zytoskelett einer Zelle durch den Basalkörper, welcher dann auch als „Mikrotubuli-organisierendes Zentrum" (engl. microtubule organizing center, MTOC) bezeichnet wird, organisiert (Brinkley, 1985). Dabei liegen die beiden Zentriolen in der so genannten „perizentriolären Masse" eingebettet vor, einem dichten Proteinkomplex, dessen Hauptkomponente das Perizentrin-Protein bildet (Doxsey *et al.*, 1994; Mogensen, 1999; Schnackenberg und Palazzo, 1999; Tassin und Bornens, 1999). In dieser Masse befinden sich weiterhin auch γ-Tubulin-Ringkomplexe (engl. γ-tubulin ring complexes, γ-TuRC), welche für die Verankerung und Nukleation der Mikrotubuli-Stränge mit dem Basalkörper sorgen (Wiese und Zheng, 1999; Zheng *et al.*, 1995). Somit kontrolliert der Basalkörper alle Mikrotubuli-assoziierten Prozesse, wie den intrazellulären Transport, die Zellform, -polarität und -adhäsion.

Beide Zentriolen des Basalkörpers sind an ihrem proximalen Ende durch Bindungsfasern miteinander verbunden (Bornens *et al.*, 1987; Paintrand *et al.*, 1992). Die maternale Zentriole kann morphologisch von der Tochterzentriole unterschieden werden, da sie nicht nur größer ist, sondern an einem ihrer Enden zwei Arten von Fibrillen besitzt. Subdistale und distale Fibrillen zeichnen sie als reife Mutterzentriole aus (Bornens, 2002). Durch die subdistalen Fibrillen ist die maternale Zentriole mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett der Zelle verbunden (Piel *et al.*, 2000). Die Mikrotubuli werden dort gebündelt mit dem Basalkörper verankert. Als distale Fibrillen werden neun radiär angeordnete Ausläufer bezeichnet, die

vom B-Tubulus der Mikrotubuli der maternalen Zentriole entspringen. Der Ursprung der distalen Fibrillen befindet sich auf der Höhe der Termination der C-Tubuli, von wo aus sie bis zur Plasmamembran der Zelle ragen (Anderson, 1972). Während der Interphase sorgen die distalen Fibrillen für die Verankerung der maternalen Zentriole an der Plasmamembran und ermöglichen das Auswachsen einer Zilie (Bornens, 2002; Gilula und Satir, 1972). Da die Fibrillen nach dem Auswachsen der Zilie proximal von der Transitionszone (siehe Abschnitt 1.3.3) lokalisieren, werden sie in dieser Phase auch als Transitionsfibrillen bezeichnet.

1.3.2 Das Axonem

Das Axonem ist ein formgebendes, aus Mikrotubuli bestehendes Skelett, welches von einer speziellen, ziliären Membran umgeben ist. Dabei geht die Triplett-Mikrotubuli-Struktur des Basalkörpers in eine Duplett-Struktur („9+0"-Konformation) über (Abbildung 1.1). Nur die Fasern des A- und B-Tubulus der Mutterzentriole werden verlängert und bilden das radiärsymmetrische Axonem der Zilie aus (Anderson, 1972; Warner und Satir, 1973). Der Bereich einer Zilie, innerhalb dessen die Mikrotubuli-Struktur von einem Triplett in ein Duplett wechselt, wird als „Transitionszone" (TZ) bezeichnet (Dute und Kung, 1978). Im Axonem bestehen die Tubulin-Fasern ebenfalls aus α- und β-Untereinheiten, die hier zahlreiche post-translationale Modifikationen innehaben können, beispielsweise Acetylierungen, Detyrosinierungen, Glutamylierungen oder Glycinylierungen (Gaertig und Wloga, 2008; Péchart *et al.*, 1999). Weiterhin verleihen die α- und β-Dimere dem ziliären Axonem eine strukturelle und kinetische Polarität, da die Minus-Enden (α-Tubulin) der Mikrotubuli am Basalkörper zu finden sind, während die Plus-Enden (β-Tubulin) in der Spitze der Zilie liegen (Heidemann und McIntosh, 1980).

Anhand der axonemalen Mikrotubuli-Ultrastruktur können zwei verschiedene Zilientypen unterschieden werden. Während es sich bei „9+0"-Zilien hauptsächlich um sensorische, also primäre Zilien handelt, weisen die meisten motilen Zilien eine „9+2"-Konformation auf (De Robertis, 1956). Sie besitzen im Zentrum der neun radiär angeordneten Mikrotubuli-Stränge ein additives, zentrales Mikrotubuli-Paar, welches für die motorischen Fähigkeiten von Bedeutung ist. Weiterhin zeichnen sich motile Zilien durch äußere und innere Dyneinarme und radiäre Speichen aus, die an die Mikrotubuli-Dupletts des Axonems angeheftet sind. Primäre Zilien sind normalerweise immotil, mit der Ausnahme der Knotenzilien. Der Knoten ist eine transiente Struktur, die während der Gastrulation in

Säugetieren und Vögeln entsteht. Obwohl diese Zilien eine „9+0"-Konformation aufweisen, haben sie dennoch motorische Fähigkeiten, die zu einem Flüssigkeitsfluss führen, der die Spezifizierung der Links-Rechts-Achse beeinflusst (Bonnafe *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2000; Nonaka *et al.*, 2002). Ausnahmen findet man auch unter motilen Zilien, z.B. Kinozilien, die trotz einer „9+2"-Konformation sensorische Fähigkeiten besitzen (Ibañez-Tallon *et al.*, 2003).

Das Axonem primärer Zilien ist von der ziliären Membran umgeben. Es ist bekannt, dass diese eine, sich von der Plasmamembran der Zelle unterscheidende, Proteinkomposition aufweist. Sie ist reich an Signalmolekülen und Rezeptoren, welche essentiell für die intrazelluläre Signalweiterleitung der Zilie sind (Emmer *et al.*, 2010; Rohatgi und Snell, 2010). Der Übergang von der ziliären Membran zur Plasmamembran wird als „periziliäre Membran" bezeichnet. Bei manchen Zelltypen können hier auch noch erweiterte periziliäre Membrantaschen ausfindig gemacht werden. Diese Invaginationen der Membran entstehen durch die tiefere Einsenkung der Zilienbasis in den Zellkörper (Molla-Herman *et al.*, 2010). Die periziliäre Membran ist die Andockstelle für Lipidvesikel, die zur Zilienbasis transportiert werden und dort mit der Membran fusionieren (Bouck, 1971; Nachury *et al.*, 2010; Papermaster *et al.*, 1985; Peters *et al.*, 1983).

1.3.3 Die Transitionszone

Als Transitionszone (TZ) wird ein kleines, evolutionär jedoch hoch konserviertes Subkompartiment der Zilien bezeichnet. Es ist der Bereich einer Zilie, der vom distalen Ende der Mutterzentriole (den Transitionsfibrillen) begrenzt wird und bis zum proximalen Anfang des Axonems reicht. Morphologisch kann diese Zone als massedichtes Material im Transmissionselektronenmikroskop wahrgenommen werden. Ihre charakteristische Struktur stellen dabei multiple Reihen von neun Y-förmigen Verbindungen (engl. linkers) dar, die für die Verknüpfung der Duplett-Mikrotubuli mit der ziliären Membran sorgen (Abbildung 1.1) (Craige *et al.*, 2010; Ishikawa und Marshall, 2011). Die ziliäre Membran ist an dieser Stelle durch viele kleine Membranpartikel gekennzeichnet, die in aufgereihten, ringsum laufenden Bahnen angeordnet sind und per Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie detektiert werden können (Fisch und Dupuis-Williams, 2011; Gilula und Satir, 1972; Hufnagel, 1983; Menco, 1980; Sattler und Staehelin, 1974). Es wird vermutet, dass die Membranpartikel durch die Fusion von Membranvesikeln mit der

ziliären Membran entstehen. Wie dieser Vorgang jedoch im Detail funktioniert, ist noch unklar. Die TZ endet mit der letzten Reihe der Y-Verbindungen.

Bis heute ist die genaue Funktion der TZ noch ungeklärt. Einige Proteine der TZ haben eine Aufgabe in der Strukturbildung der TZ oder des Axonems (Craige *et al.*, 2010; Van Reeuwijk *et al.*, 2011), andere Proteine sind für die Verankerung der Mutterzentriole mit der Plasmamembran verantwortlich (Graser *et al.*, 2007). TZ-Proteine können auch mit Komponenten des Intraflagellar-Transports interagieren und diese zur Basis der Zilie rekrutieren (Zhao und Malicki, 2011). In einigen Spezies (*C. elegans* und Maus) werden TZ-Proteine außerdem für die Ziliogenese benötigt (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011). Weiterhin sind TZ-Proteine an der Bildung einer selektiven Diffusionsbarriere beteiligt. Sie fungieren als Grenze zwischen dem Zilienkompartiment und dem restlichen Zellkörper und werden daher oft auch als so genannte „Torwächter" der Zilie bezeichnet (Omran, 2010). Somit bestimmen TZ-Proteine darüber, welchen Proteinen der Zutritt in die Zilie gewehrt wird und welchen nicht (Deane *et al.*, 2001; Dute und Kung, 1978; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011).

Trotz des wachsenden Wissens über den ultrastrukturellen Aufbau der TZ ist die molekulare Zusammensetzung dieser noch weitestgehend unbekannt. In *C. elegans* konnte die molekulare Komposition der TZ bislang am detailliertesten beschrieben werden (Williams *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass sich das TZ-Netzwerk aus vier miteinander kommunizierenden Multiproteinkomplexen zusammensetzt: dem Nphp1-4-8-Modul, dem Nphp5-6-Modul, dem Inversin-Kompartiment und dem Mks/B9-Modul (Abbildung 1.2) (Czarnecki und Shah, 2012; Sang *et al.*, 2011). Dabei werden die ersten drei Module zusammenfassend auch als Nphp-Modul bezeichnet und stehen dem Mks/B9-Modul gegenüber (Sang *et al.*, 2011). Alle Module der TZ interagieren miteinander und sollen, in einer Hierarchie angeordnet, zur Integrität der TZ beitragen (Czarnecki und Shah, 2012).

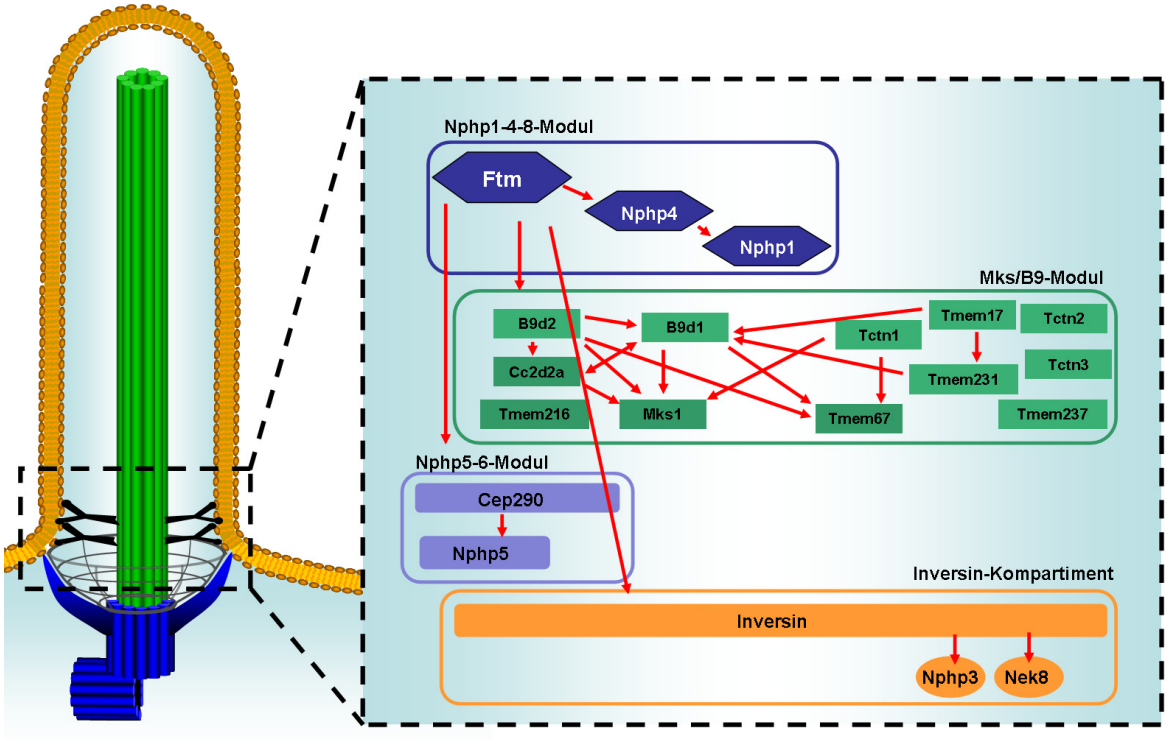

Abbildung 1.2: Transitionszonen-Module.
Genetische Untersuchungen in *C. elegans* und in der Maus lassen zwei verschiedene Multiproteinkomplexe in der TZ vermuten: das Nphp- und das Mks/B9-Modul. Das Nphp-Modul kann des Weiteren in drei Komplexe unterteilt werden: das Nphp1-4-8-Modul, das Nphp5-6-Modul und das Inversin-Kompartiment. Zusammen sind alle Komplexe für die Integrität und Funktion der TZ zuständig. Ftm (Nphp8) lokalisiert unabhängig und beeinflusst die Lokalisierung aller anderen Modulproteine in der TZ. Modifiziert nach Czarnecki und Shah (Czarnecki und Shah, 2012).

1.3.3.1 Das Nphp1-4-8-Modul

Ftm (auch Nphp8 oder Rpgrip1l genannt) ist eine Komponente des Nphp1-4-8-Komplexes. Es soll in *C. elegans* für die Organisation aller Proteinkomplexe der TZ zuständig sein (Williams *et al.*, 2011). In der TZ von *C. elegans* lokalisiert Ftm komplett unabhängig von den bekannten TZ-Proteinen und steht somit ganz oben in der Hierarchie (Czarnecki und Shah, 2012). In Vertebraten ist die Einordnung von Ftm in die TZ-Hierarchie noch unerforscht und sollte daher im Rahmen dieser Dissertation analysiert werden. Es wird lediglich vermutet, dass Cspp1, ein Zentrosom- und Spindel-assoziiertes Protein, in hTERT-RPE1-Zellen die Lokalisierung von Ftm in der TZ beeinflussen könnte (Patzke *et al.*, 2010). Des Weiteren zeigen erste Analysen in IMCD3-Zellen, dass Ftm für die Lokalisierung von Tmem237 (einem Mks/B9-Protein) in der TZ benötigt wird (Huang *et al.*, 2011).

Nphp1 ist in Vertebraten als Andockprotein für zahlreiche Adaptoren der Zytoskelett-Organisation und Zelladhäsions-Regulation bekannt (Benzing *et al.*, 2001; Donaldson *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2002). In *C. elegans* sorgt es für die Verankerung des Basalkörpers an der Plasmamembran (Williams *et al.*, 2011). Weiterhin reguliert Nphp1 zusammen mit Nphp4 zelltypspezifisch die Länge und Morphogenese von Zilien in *C. elegans*, da beide Proteine für die korrekte Ausbildung der B-Tubuli des Axonems zuständig sind (Jauregui *et al.*, 2008). Die molekulare Grundlage dieser Verbindung ist noch unklar, allerdings konnte gezeigt werden, dass sowohl Nphp1 als auch Nphp4 mit Tubulin-Komponenten assoziiert vorliegen (Mollet *et al.*, 2005; Otto *et al.*, 2003). Ferner gilt die Deformation des Axonems als Ursache für eine fehlerhafte Verteilung von IFT-Komponenten in *C. elegans nphp1;nphp4*-Deletionsmutanten und führt dort zur Beeinträchtigung des Transports ziliärer Proteine (Jauregui *et al.*, 2008). Interessanterweise sind sowohl Nphp1, als auch Nphp4 zwar in der TZ lokalisiert, aber sie werden nicht für die ultrastrukturelle Formation dieser benötigt. Auch hat der Ausfall beider Proteine in *C. elegans* keine Auswirkung auf die Lokalisierung von Mks/B9-Proteinen (Williams *et al.*, 2011). Zugleich sind zwar beide Komponenten in ziliäre Signaltransduktionen involviert (Habbig *et al.*, 2011; Jauregui und Barr, 2005), aber wahrscheinlich werden sie nicht für die Lokalisierung von Rezeptorproteinen in der ziliären Membran benötigt (Jauregui *et al.*, 2008). Der Phänotyp der *Nphp1*$^{-/-}$- oder *Nphp4*$^{-/-}$-Mausmutanten ist bislang unzureichend beschrieben, doch scheint der Verlust beider Proteine nur milde Defekte zur Folge zu haben ((Won *et al.*, 2011) mündliche Mitteilung Sylvie Schneider-Maunoury). Des Weiteren sorgt Nphp4 für die subzelluläre Lokalisierung von Nphp1 in der TZ, da nach einem *NPHP4*-Knockdown Nphp1 in trans-Golgi-Vesikel akkumuliert (Liebau *et al.*, 2011). Die TZ-Lokalisierung von Nphp4 ist dagegen unabhängig von Nphp1 (Winkelbauer *et al.*, 2005). Additiv ist gezeigt worden, dass die Morphologie der *nphp1;nphp4*-Doppelmutanten in *C. elegans* der einer *nphp4*-Einzelmutante gleicht, was darauf hindeutet, dass *nphp4* epistatisch zu *nphp1* ist. Auch gibt es eine direkte Interaktion lediglich zwischen Nphp1 und Nphp4, aber keine zwischen Nphp1 und Ftm (Sang *et al.*, 2011). Dies deutet darauf hin, dass Nphp4 den zweithöchsten Rang im Nphp1-4-8-Komplex einnimmt, während Nphp1 die niedrigste Position innerhalb der Nphp1-4-8-Hierarchie innehat.

1.3.3.2 Das Nphp5-6-Modul

Cep290 (auch bekannt als Nphp6) ist die Hauptkomponente des Nphp5-6-Moduls (Sang *et al.*, 2011). Es ist ein Strukturprotein der Y-Verbindungen in *Chlamydomonas* und dort mit der Flagellarmembran und den axonemalen Mikrotubuli assoziiert. Die Depletion von *CEP290* resultiert in deformierten Flagellen und einer veränderten flagellaren Proteinkomposition basierend auf dem Verlust der basalen Diffusionsbarriere (Craige *et al.*, 2010). Da kein homologes Cep290 in *C. elegans* existiert, fehlen bislang wichtige Informationen über die TZ-Funktion dieses Proteins (Hodges *et al.*, 2010). Cep290 interagiert modulübergreifend mit Tectonic1, einer Komponente des Mks/B9-Moduls (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). In IMCD3-Zellen wird Cep290 benötigt um Nphp5 zum Basalkörper zu rekrutieren, während die ziliäre Lokalisierung von Cep290 unabhängig von Nphp5 ist (Sang *et al.*, 2011). Nphp5 soll zusammen mit B9d2 und Inversin den Transport nicht-struktureller, Intraflagellar-Transport-assoziierter Proteine fördern (Zhao und Malicki, 2011).

1.3.3.3 Das Mks/B9-Modul

Das Mks/B9-Modul ist ein Multiproteinkomplex der reich an Membranproteinen ist und viele Mitglieder mit Membran-assoziierten B9- und C2-Domänen enthält. Mks1 und die verwandten Proteine B9d1 und B9d2 enthalten alle eine solche B9-Domäne, die eine potentielle Phospholipidbindung ermöglicht. Der Verlust eines oder aller drei Proteine hat jedoch in *C. elegans* keine signifikanten Ziliendefekte zur Folge (Bialas *et al.*, 2009; Kyttala *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008). Mks1 ist weiterhin in die Basalkörper-Migration und Verankerung involviert (Dawe *et al.*, 2007). In NIH3T3-Zellen kann Mks1 mit drei Proteinen der Tectonic (Tctn)-Familie (Tctn1-3) interagieren. All diese Proteine sind in die Entwicklung des Neuralrohrs und den damit verbundenen Shh-Signalweg involviert (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011; Reiter und Skarnes, 2006; Sang *et al.*, 2011; Weatherbee *et al.*, 2009). Außerdem ist Tctn1 gewebeabhängig essentiell für die Ziliogenese. In Zelltypen, die Tctn1 nicht für die Ziliengenerierung benötigen, ist das Protein für die selektive Lokalisierung Membran-assoziierter Proteine wie Arl13b oder Smoothened wichtig (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Weiterhin interagiert Tctn1 mit zahlreichen Proteinen des Mks/B9-Moduls: B9d1, Cc2d2a, Tmem67 und Tmem216 und ist für die TZ-Lokalisierung von Mks1 und Tmem67 verantwortlich. Zusammen mit den TZ-

Proteinen Tmem17, Tmem67, Tmem231, Tmem237 gehören Tctn2 und Tctn3 zur Gruppe der TZ-Transmembranproteine.
In *C. elegans* hat eine kombinierte Mutation in einem Mks/B9-Modul-Gen zusammen mit einem Nphp1-4-8-Gen die schwerwiegendsten Folgen für die Integrität der TZ, die sich sogar in ultrastrukturellen Veränderungen bemerkbar machen, z.B. im kompletten Fehlen der Transitionsfibrillen oder der Y-Verbindungen (Williams *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2008). Dies deutet auf eine redundante Funktion beider Komplexe hin.

1.3.3.4 Das Inversin-Kompartiment

In direkter, distaler Nachbarschaft zur TZ befindet sich das Inversin-Kompartiment, dessen Hauptkomponente das namensgebende Inversin (Invs) ist (Shiba *et al.*, 2010; Warburton-Pitt *et al.*, 2012). Invs soll eine modulverbindende Brücken-Funktion ausüben, indem es mit Komponenten aller anderen Module interagiert (Nphp1, Nphp5 und B9d2) (Czarnecki und Shah, 2012; Otto *et al.*, 2005; Otto *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2011). Weiterhin ist das Inversin-Kompartiment gewebeabhängig sehr dynamisch; es reicht vom Basalkörper bis zu einer variablen Extension ins distale Axonem hinein (Otto *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2011; Shiba *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2005). Die Depletion von Proteinen des Inversin-Kompartiments hat bislang keine Auswirkung auf die Formation der TZ; weder Nphp- noch Mks/B9-Modul-Proteine benötigen Invs in *C. elegans*, um in der TZ zu lokalisieren (Shiba *et al.*, 2009; Warburton-Pitt *et al.*, 2012). Es konnte jedoch demonstriert werden, dass B9d2 die Lokalisierung von Invs in der TZ fördert (Zhao und Malicki, 2011). Zudem ist bekannt, dass der Verlust von Invs zu keinen morphologischen Veränderungen von Zilien führt (Otto *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2003). Ergänzend findet man auch Nphp3 und Nphp9 im Inversin-Kompartiment (Shiba *et al.*, 2010).

1.4 Ziliopathien

Genetische Defekte, die zu Beeinträchtigung der Zilienstruktur oder -funktion führen, werden mit einem weiten Spektrum an menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht, die man zusammenfassend als Ziliopathien bezeichnet (Badano *et al.*, 2006). Dabei spiegelt die immense phänotypische Bandbreite der Erkrankungen wider, wie wichtig Zilien für die Entwicklung und Funktion zahlreicher Organe im Menschen sind. Ziliopathien sind durch variable und überlappende, phänotypische Ausprägungen wie

Retinopathien, Nierenerkrankungen, mentale Retardierung, Polydaktylie, Adipositas, zerebrale Hypoplasie, Heterotaxie, Lebererkrankungen, kraniofaziale Defekte, Enzephalozele, Thorax-Dystrophie und Verkürzung der Gliedmaßen gekennzeichnet (Fliegauf *et al.*, 2007). Um ein besseres Verständnis für die Ursache von Ziliopathien zu entwickeln, versucht man die Charakterisierung aller verantwortlichen Gene und Proteine vorzunehmen. Bis heute sind Mutationen in über 28 Genen (z.B.: *NPHP1-12*, *B9D1-2*, *ARL13B*, *TCTN1-3*, *TMEM216*, *MKS1*, *KIF7* und *MKS6/CC2D2A*) bekannt, die mit verschiedenen Ziliopathien wie dem Joubert-Syndrom (JBTS), Meckel-Gruber-Syndrom (MKS), Bardet-Biedl-Syndrom (BBS), McKusick-Kaufmann-Syndrom (MKKS), Senior-Løken-Syndrom (SLS), Oral-fazial-digital-Syndrom (OFD), Alström-Syndrom (ALS), Sensenbrenner-Syndrom (CED), Nephronophthise (NPHP), Leber`sche kongenitale Amaurose (LCA), Polyzystische Nierenerkrankung (PKD), Kurzripp-Polydaktylie-Syndrom (SRP), Asphyxierende Thorax-Dystrophie (JATD) und der Primären ziliären Dyskinesie (PCD) assoziiert werden (Czarnecki und Shah, 2012; Hildebrandt *et al.*, 2009; Lee und Gleeson, 2010; Tallila *et al.*, 2008). Verschiedene Mutationen desselben Gens können in unterschiedlichen Ziliopathien resultieren. Beispielsweise finden sich *NPHP1*-Mutationen sowohl in Patienten mit NPHP, als auch mit JBTS (Parisi *et al.*, 2007). Weiterhin sind Mutationen in *NPHP3* und *CEP290* in alle drei NPHP-, JBTS- und MKS-Syndrome involviert (Baala *et al.*, 2007; Bergmann *et al.*, 2008; Olbrich *et al.*, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass Mutationen in verschiedenen Genen die gleichen Ziliopathien auslösen, nimmt man an, dass die entsprechenden Proteine in einem gemeinsamen Netzwerk bzw. Signalweg agieren (Sang *et al.*, 2011).

Auch Mutationen im humanen *FTM*-Gen führen zu schweren Ziliopathien, welche die autosomal rezessiven Erkrankungen NPHP, JBTS und MKS implizieren (Arts *et al.*, 2007; Delous *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2007). NPHP ist die mildeste Erkrankung der Gruppe und wird durch renale Zysten, retinale Degenerierung (dann als Senior-Løken-Syndrom bezeichnet), Heterotaxie und mentale Retardierung charakterisiert (Hildebrandt *et al.*, 2009). JBTS involviert sowohl renale als auch nicht-renale Manifestationen der NPHP-Erkrankung und unterscheidet sich durch die cerebelläre Vermis Aplasie, einer signifikanten Fehlbildung des Cerebellums, die Ataxie hervorruft (Parisi *et al.*, 2007). Eine der schwersten und perinatal letalen Ziliopathien stellt das MKS dar. Es wird durch okzipitale Enzephalozele, Polydaktylie, Leberfibrose, und schwere Nierenzysten charakterisiert (Salonen und Paavola, 1998).

1.5 Der Zilien-Zentriolen-Zentrosomen-Zyklus

Der Zilien-Zentriolen-Zentrosomen-Zyklus beschreibt die duale Funktion von Zentriolen als Komponenten des Basalkörpers und des Zentrosoms (Pan und Snell, 2007). Die Bildung einer Zilie ist unmittelbar an den Zellzyklus gekoppelt (Abbildung 1.3). Der Zellzyklus kann in vier Phasen unterteilt werden: die G_1-Phase, die S-Phase, die G_2-Phase und die Mitose. Die ersten drei Stadien werden zusammengefasst auch als „Interphase" bezeichnet. In der G_1-Phase bildet die Mutterzentriole des Basalkörpers das Axonem der Zilie aus, wobei sie sich mittels ihrer distalen Transitionsfibrillen an der Plasmamembran fest verankert (Anderson, 1972; Sorokin, 1962, 1968). Zellen, die sich in der G_1-Phase befinden, zeichnen sich durch Wachstum, eine vermehrte Proteinbiosynthese und einen erhöhten Metabolismus aus. Wenn eine Zelle das Signal zur Proliferation erhalten hat, fängt sie damit an, das Axonem der Zilie zu resorbieren. Zudem werden viele ihrer Organellen verdoppelt, wie die Zentriolen, welche noch an der Plasmamembran dupliziert werden (Rieder *et al.*, 1979; Tucker *et al.*, 1979). Zunächst verlieren die Zentriolen des Basalkörpers ihre Orthogonalität zueinander, ein Vorgang, der auch als „Desorientierung" bezeichnet wird (Kochanski und Borisy, 1990). Dann reift die ehemalige Tochterzentriole zur vollwertigen, maternalen Zentriole mit den charakteristischen distalen und subdistalen Fibrillen heran, ein Vorgang, der bis in die frühe Mitose andauern kann. Gleichzeitig bildet sich an ihrem proximalen Ende eine neue Prozentriole aus (Rieder und Borisy, 1982; Vorobjev und Chentsov, 1982). Auch die ältere Mutterzentriole dient nun erneut als Matrize für eine neue Prozentriole. In proliferierenden Zellen werden Zentriolen nur einmal pro Zellzyklus dupliziert, damit gewährleistet wird, dass jede Zelle zwei Zentrosomen und somit exakt einen Spindelapparat besitzt, der die Chromosomen gleichmäßig verteilt. Fehler während der Duplikation von Zentrosomen führen zur Ausbildung von multipolaren Spindelapparaten und somit zu Defekten während der Chromosomen-Segregation (Lingle *et al.*, 1998; Pihan *et al.*, 1998).

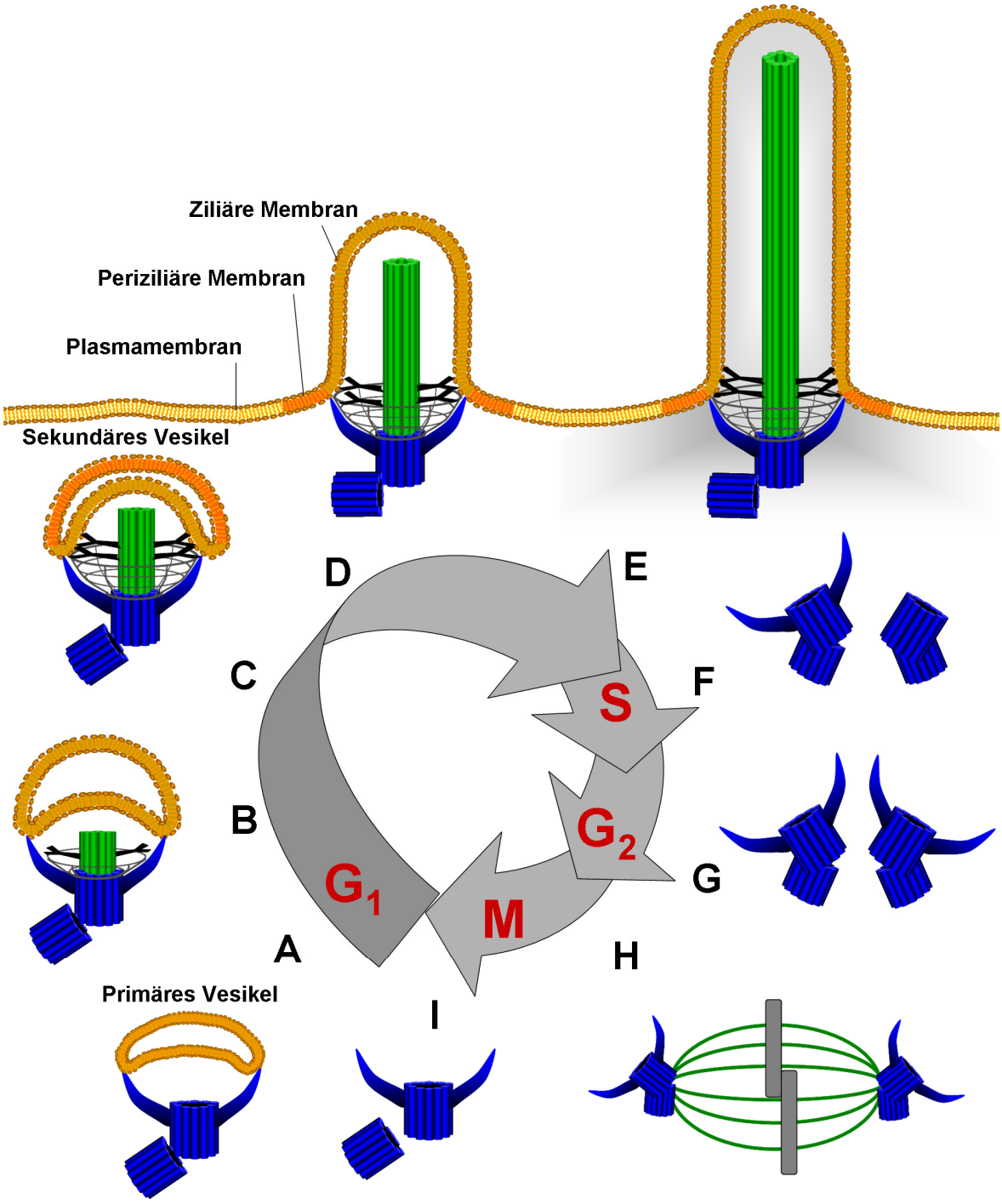

Abbildung 1.3: Der Zilium-Zentriolen-Zentrosomen-Zyklus.

(A) Die Zilienbildung startet während der frühen G_1-Phase des Zellzyklus, wenn an die Mutterzentriole ein aus dem Golgi stammendes ziliäres Vesikel andockt. (B) Die Mutterzentriole fungiert als Matrize zur Verlängerung des Axonems, an dessen proximalem Ende sich parallel die TZ bildet. (C) Das ziliäre Vesikel wächst mit dem Axonem und wird durch ein weiteres andockendes Vesikel in eine innere und eine äußere Membran definiert. Die äußere Membran fusioniert mit der Plasmamembran und wird zur periziliären Membran, während die innere Membran zur ziliären Membran wird. Gleichzeitig docken die Transitionsfibrillen der Mutterzentriole an die Plasmamembran an und verankern diese. (D) Die Elongation des Axonems

bewirkt das Auswachsen an der Oberfläche, bis eine funktionsfähige Zilie generiert ist. (E) Zellen, die proliferieren wollen, fangen an, ihr Axonem zu depolymerisieren. (F) Der Basalkörper wird zum Zentrosom konvertiert und noch an der Plasmamembran während der frühen S-Phase dupliziert. (G) In der G_2-Phase bis zur Metaphase der Mitose reift die ehemalige Tochterzentriole zu einer vollwertigen Mutterzentriole heran. (H) Während der Mitose fungieren beide Zentrosomen als MTOCs an den Polen des Spindelapparates und sorgen für eine korrekte Separierung des genetischen Materials. (I) Jedes Zentrosom wird einer der beiden Tochterzellen zugeteilt und fungiert als Basalkörper in der folgenden Interphase.

Im weiteren Verlauf des Zellzyklus kommt es zur Replikation des genetischen Materials, womit der Eintritt der Zelle in die S-Phase beginnt. Während der G_2-Phase reichern die beiden Zentrosomen perizentrioläres Material an (Khodjakov und Rieder, 1999). Durch die erhöhte Anzahl an γ-TuRCs kann das Mikrotubuli-Zytoskelett einer Zelle in der folgenden Mitose von den beiden Zentrosomen genauestens kontrolliert werden. Das Mikrotubuli-Zytoskelett ist in der Mitose besonders wichtig, denn es zeigt sich für die Ausbildung der Spindel verantwortlich. Nach der Verteilung des genetischen Materials wird jedes der beiden Zentrosomen den neu entstandenen Zellen zugeteilt. Wenn die Teilung der Zellen abgeschlossen ist, konvertieren die Zentrosomen erneut zum Basalkörper. Die Ausbildung einer Zilie, auch als „Ziliogenese“ bezeichnet, startet, nachdem ein ziliäres Membranvesikel im Zytoplasma an die Mutterzentriole des Zentrosoms andockt (Sorokin, 1962, 1968). Gleichzeitig werden Tubulin-Dimere zum Plus-Ende der A- und B-Tubuli an der maternalen Zentriole transportiert und mit den vorhandenen Tubulinen verbunden. Die Axonemelongation findet somit immer an der Zilienspitze statt (Johnson und Rosenbaum, 1992; Song und Dentler, 2001; Stephens, 2000). An der Basis bildet sich gleichzeitig die TZ, in der die charakteristischen Y-Verbindungen eine Verknüpfung zwischen dem Axonem und der ziliären Membran schaffen (Boisvieux-Ulrich *et al.*, 1989; Rosenbaum und Child, 1967). Parallel zur Elongation des Axonems muss auch die ziliäre Membran expandiert werden. Abhängig vom Zelltyp kann die Expansion der ziliären Membran an der Oberfläche der Plasmamembran (so wie in Epithelzellen) oder intrazellulär stattfinden (beispielsweise in Fibroblasten, siehe auch Abbildung 1.3) (Sorokin, 1962, 1968). Im letzteren Fall fusioniert das ziliäre Membranvesikel mit einem zweiten, sekundären Vesikel und schafft somit eine Hülle mit einer inneren und einer äußeren Membranoberfläche. Die innere Membran bildet später die ziliäre Membran aus, während die äußere Membran als periziliäre Membran fungiert (Bouck, 1971; Nachury *et al.*, 2010; Papermaster *et al.*, 1985; Peters *et al.*, 1983). Durch die Fusionierung der äußeren

Membranhülle mit der Plasmamembran kommt es zum Kontakt zwischen der Zilie und dem extrazellulären Raum. Dabei bestimmt alleinig der Basalkörper durch seine Positionierung und Orientierung über die Ausrichtung der Zilie. In Epithelzellen wird die Oberfläche der ziliären Membran durch eine laterale Diffusion von Lipiden vergrößert. Zusätzlich können auch Lipidvesikel zur Zilienbasis transportiert werden (siehe auch Abschnitt 1.7). Nachdem das Axonem seine endgültige Länge erreicht hat, kann die Zilie als sensorische Antenne fungieren und die Transduktion verschiedenster Signalkaskaden induzieren. Doch auch nach dem Auswachsen der Zilie bleibt diese hoch dynamisch, denn das Axonem wird ständig neusynthetisiert. Tubuline werden kontinuierlich an das Plusende der Mikrotubuli in der Zilienspitze angebaut (Johnson und Rosenbaum, 1992). Das Axonem jedoch elongiert nicht weiter, da auch ein kontinuierlicher Abbau von Tubulinen stattfindet. Solange sich der Auf- und Abbau von Mikrotubuli in einem Gleichgewicht befindet, wird die Länge der Zilie beibehalten (Ishikawa und Marshall, 2011). Wird dagegen einer der beiden Vorgänge beschleunigt, kommt es entweder zu einer Verkürzung, oder zu einer Verlängerung der Zilie. Somit muss eine Zelle nicht nur die Ziliogenese kontrollieren, sondern auch den Zilienerhalt regulieren.
Zellen in der G_1-Phase können nun erneut Proliferationssignale empfangen und in die Mitose einsteigen. Andere Zellen, die nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen, verweilen in der G_1-Phase, die dann auch als „G_0- Phase“ oder „Arrest-Phase“ bezeichnet wird.

1.6 Der Intraflagellar-Transport

Für die Assemblierung und den Erhalt von Zilien müssen kontinuierlich neue Strukturproteine in die Zilienspitze transportiert und alte recycelt werden (Qin *et al.*, 2004). Da die Neusynthese von Strukturproteinen im Zytoplasma und nicht in der Zilie stattfindet, benötigt die ununterbrochene Erhaltung des Axonems einen selektiven Import und Export von Proteinen. Dieser Transport wird als „Intraflagellar-Transport“ (IFT) bezeichnet (Kozminski *et al.*, 1995; Kozminski *et al.*, 1993; Rosenbaum und Witman, 2002). Der IFT ist eine bidirektionale Beförderung von Multiproteinkomplexen auf den Mikrotubuli-Strängen des Axonems (Abbildung 1.4). Defekte im IFT haben eine gestörte Ziliogenese zur Folge, die in verkürzten, missgebildeten oder erst gar nicht vorhandenen Zilien resultiert. Der IFT wurde in den Flagellen der Grünalge *Chlamydomonas* entdeckt. Mit Hilfe der differentiellen Kontrast-Interferenz konnten kleine Partikel, die von der Zilienbasis zur Spitze (anterograder Transport) und wieder zurück (retrograder Transport)

wanderten, beobachtet werden. Zwei evolutionär hoch konservierte IFT-Komplexe, IFT-A und IFT-B, werden benötigt, um eine Zilie zu generieren und aufrechtzuerhalten (Cole, 2003; Pedersen *et al.*, 2006). Sowohl der IFT-B-Komplex als auch das heterotrimere Kinesin-2 werden für den anterograden Transport benötigt (Cole *et al.*, 1998; Kozminski *et al.*, 1995; Matsuura *et al.*, 2002; Walther *et al.*, 1994), wohingegen der IFT-A-Komplex zusammen mit dem zytoplasmatischen Dynein-2-Motor hauptsächlich für den retrograden Transport zuständig ist (Hou *et al.*, 2004; Pazour *et al.*, 1999; Pedersen und Rosenbaum, 2008; Perrone *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 1999). In Kooperation mit den Motorproteinen binden die IFT-A- oder IFT-B-Komplexe andere zu transportierende Fracht-Proteine und befördern diese entlang der B-Tubuli (Kozminski *et al.*, 1995; Kozminski *et al.*, 1993). Die zwei IFT-Komplexe spielen komplementäre, jedoch distinkt unterschiedliche Rollen im Transport von ziliären Proteinen. Während der IFT-B-Komplex unabdingbar für die Ziliogenese und den Erhalt von Zilien ist, wird der IFT-A-Komplex nicht für den Aufbau von Zilien benötigt (Absalon *et al.*, 2008; Efimenko *et al.*, 2006; Iomini *et al.*, 2001; Iomini *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2008; Tsao und Gorovsky, 2008). Biochemische Studien haben sechs IFT-A-Proteine identifiziert, die gemeinsam einen stabilen Komplex bilden (siehe Liste in Abbildung 1.4) (Behal *et al.*, 2012; Piperno *et al.*, 1998). Dass der IFT-A-Komplex eine Funktion im retrograden Transport einnimmt, wurde erstmals in *Chlamydomonas* gezeigt. Dort entwickeln IFT-A-Mutanten Zilien normaler Länge, jedoch mit einer Bulbus-artigen Ausstülpung an der Zilienspitze, die auf eine Akkumulierung von IFT-Partikeln hindeutet (Iomini *et al.*, 2001; Iomini *et al.*, 2009; Piperno *et al.*, 1998). Der IFT-B-Komplex enthält ca. 13 Proteine (siehe Liste in Abbildung 1.4) (Follit *et al.*, 2009; Lucker *et al.*, 2005). Ist er defekt, haben Zellen verkürzte oder gar keine Zilien (Brazelton *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2007; Pazour *et al.*, 2000). Eine Komponente des IFT-B-Komplexes stellt Ift88 dar. Es ist unabdingbar für die Ziliogenese, denn Zellen ohne Ift88 sind unfähig, Zilien auszubilden (Pazour *et al.*, 2002; Pazour *et al.*, 2000).

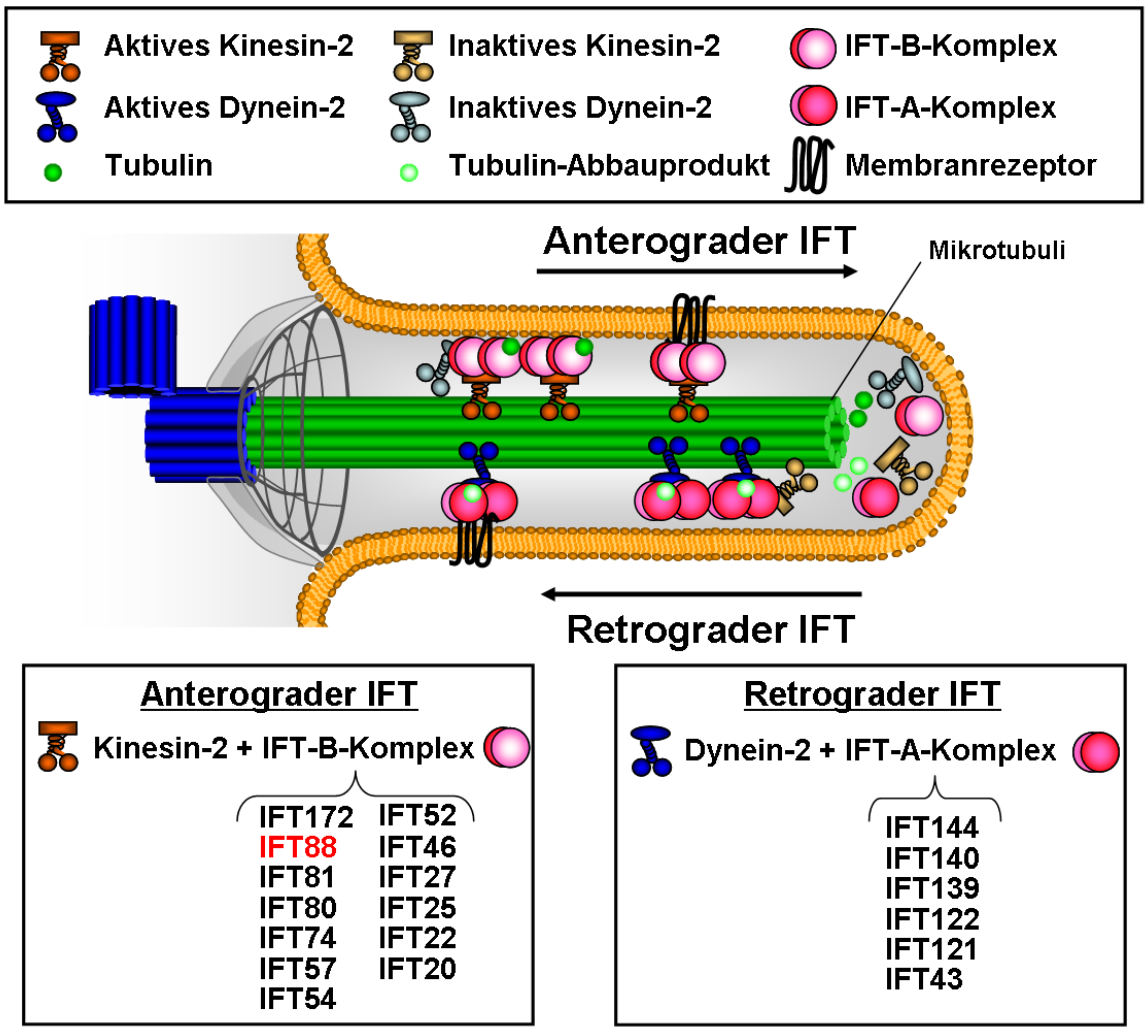

Abbildung 1.4: Der Intraflagellar-Transport (IFT).
Der IFT ist ein bidirektionaler, Mikrotubuli-assoziierter Transport, der ziliäre Proteine von der Zilienbasis zur Zilienspitze (anterograder Transport) und wieder zurück (retrograder Transport) befördert. Während des anterograden IFTs transportiert das aktive Motorprotein Kinesin-2 mit Hilfe des IFT-B-Komplexes Frachtproteine wie Tubuline und Membranrezeptoren, aber auch inaktive Dynein-Motorproteine. In der Zilienspitze angekommen werden die Frachtproteine entlassen und der IFT wird für den retrograden Transport umorganisiert. Aktives Dynein-2 befördert nun zusammen mit IFT-A-Komplex-Proteinen Abbauprodukte und inaktives Kinesin-2 zurück zur Basis.

Allgemein sind IFT-Proteine reich an Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die es ihnen ermöglichen, unterschiedlichste Proteine zu transportieren (Avidor-Reiss *et al.*, 2004; Cole, 2003). Doch angesichts der enorm hohen Anzahl an ziliären Proteinen besteht der Verdacht, dass Adaptoren existieren, die eine selektive Bindung zwischen den IFT-Komplexen und ihrer Fracht ermöglichen (Ahmed *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010). Als Fracht-Proteine werden axonemale Komponenten sowie Membran-assoziierte Rezeptoren

und Ionen-Kanäle angesehen. Wie die detaillierte Regulation der verschiedenen IFT-Parameter, z.B. der IFT-Komplexgröße, der Transport-Geschwindigkeit und der selektiven Fracht vonstattengeht, ist noch unklar. Dadurch, dass axonemale Komponenten und IFT-Proteine an den Transitionsfibrillen von Zilien in der TZ akkumulieren, scheint dort die Beladung und vielleicht sogar die Regulation des IFTs stattzufinden (Deane *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2004). Auch ist noch unbekannt, wie die Regulation der Zilienlänge realisiert wird. Beispielsweise benötigt das Auswachsen von Zilien mehr Tubulin-Transport als der Erhalt. Die Regulation der Zilienlänge scheint des Weiteren einer speziellen Kontrolle zu unterliegen, da distinkte Zelltypen unterschiedlich lange Zilien besitzen. Biochemische Studien zeigen, dass besonders Kinasen an der Regulation der Zilienlänge mitbeteiligt sind (Besschetnova *et al.*, 2010). Der IFT ist nicht nur für die Ziliogenese, den Zilienerhalt und die Zilienlängenregulation wichtig, sondern auch für die Transduktion Zilien-assoziierter Signalkaskaden (siehe Abschnitt 1.9).

1.7 Extraziliäre Transport-Mechanismen

Die Assemblierung und der Erhalt von Zilien fordern nicht nur einen kontinuierlichen IFT, sondern es müssen auch lösliche sowie Membran-gebundene Proteine aus dem Zytoplasma zur Zilienbasis transportiert werden.

1.7.1 Extraziliärer Transport Membran-gebundener Proteine

Proximal der Zilie und des Basalkörpers befindet sich der Golgi-Apparat, ein Organell, welches u.a. für die Sekretierung von Membranvesikeln zuständig ist, die wichtige ziliäre Transmembranproteine und Polypeptide enthalten (Abbildung 1.5) (Sütterlin und Colanzi, 2010). Es gibt eine große Homologie zwischen den IFT-Partikeln der Zilien und den Clathrin-beschichteten Vesikeln des Golgi, die suggeriert, dass der Zilienverkehr seinen evolutionären Ursprung im Vesikel-Transport hat (Jekely und Arendt, 2006). Der Transport von ziliären Transmembranproteinen startet im Endoplasmatischen Retikulum (ER), von wo aus die Vesikelabschnürung in Richtung Golgi-Apparat verläuft. Nach dem Erreichen des trans-Golgi-Netzwerks (TGN) werden die Transmembranproteine in Vesikeln mit verschiedenen subzellulären Bestimmungsorten sortiert. Ift20, eine Komponente des IFT-B-Komplexes ist sowohl am Golgi als auch in der Zilie lokalisiert (Follit *et al.*, 2006). Im Golgi ist sie für das Sortieren und/oder den Transport von

Proteinen, die für die ziliäre Membranlokalisierung prädestiniert sind, zuständig (Follit *et al.*, 2008). Die Plasmamembran ist normalerweise der Bestimmungsort aller vom TGN-abstammenden Vesikel, doch verschiedene Zielsequenzen an den Transmembranproteinen können diese in diverse Kompartimente verschicken (Baker *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2001). Die ziliären Lokalisierungssequenzen (engl. ciliary localization sequence, CLS) an Frachtproteinen verhelfen zur Rekrutierung von Transportproteinen, die die Vesikel zur periziliären Membran führen (Dishinger *et al.*, 2010; Nachury *et al.*, 2010). Ein GTP-Austauschfaktor (engl. guanine nucleotide exchange factor, GEF) namens Rabin8 gehört dieser Gruppe von Hilfstransportproteinen an. Rabin8 ist am Basalkörper lokalisiert und aktiviert dort die GTP-gebundene Rab8-GTPase (Blacque und Leroux, 2006; Knödler *et al.*, 2010; Westlake *et al.*, 2011). Diese vermittelt wiederum das Andocken von Membranvesikeln an die periziliäre Membran sowie deren Fusion (Jin *et al.*, 2010; Nachury *et al.*, 2007). Zusätzlich kann Rab8 auch über den GTPase-Regulator Rpgr reguliert werden. Rpgr moduliert die intrazelluläre Lokalisierung und Funktion von Rab8 und beeinflusst somit den Transport von Membranvesikeln (Murga-Zamalloa *et al.*, 2010). Der Post-Golgi-Transport von ziliengebundenen Vesikeln involviert auch Bbs-Proteine. Das BBSom, ein Multiproteinkomplex aus sieben verschiedenen Bbs-Proteinen (Bbs1/2/4/5/7/8/9), sitzt am Basalkörper von Zilien und erkennt die CLS der ziliären Frachtladung (Nachury *et al.*, 2007). Weiterhin vermittelt es die Verbindung zwischen der Frachtladung und der IFT-Maschinerie in der Nähe der Transitionsfibrillen und wird dann zusammen mit dem GTP-aktivierten Rab8 ins Innere der Zilie transportiert. Während des IFTs ist das BBSom nicht nur mit den Frachtproteinen, sondern auch mit der ziliären Membran assoziiert. Eine Komponente des BBSoms ist Bbs5. Dieses Protein soll für die Verbindung des BBSoms mit der ziliären Membran verantwortlich sein, da seine zwei PH-Domänen (engl. pleckstrin homology domain) eine Phospholipid-bindende Funktion ausüben (Nachury *et al.*, 2007).

Ein Beispiel für den Transport von Transmembranproteinen stellt der Somatostatinrezeptor3 (Sstr3) dar. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor (engl. G protein-coupled receptor, GPCR) enthält auf seiner dritten intrazellulären Schleife eine CLS, welche die Bindung zum BBSom generiert und somit den Eintritt in die Zilie legitimiert (Berbari *et al.*, 2008). Weiterhin haben Zilien-assoziierte Golgi-Vesikel die Möglichkeit zunächst zur Plasmamembran transportiert zu werden und dort mit dieser zu verschmelzen. Erst im Anschluss erfolgt die laterale Diffusion über die periziliäre Membran in die Zilie

hinein. Eine freie, laterale Diffusion von Membranproteinen wird jedoch durch eine periziliäre Diffusionsbarriere an der Zilienbasis verhindert (Nachury *et al.*, 2010).

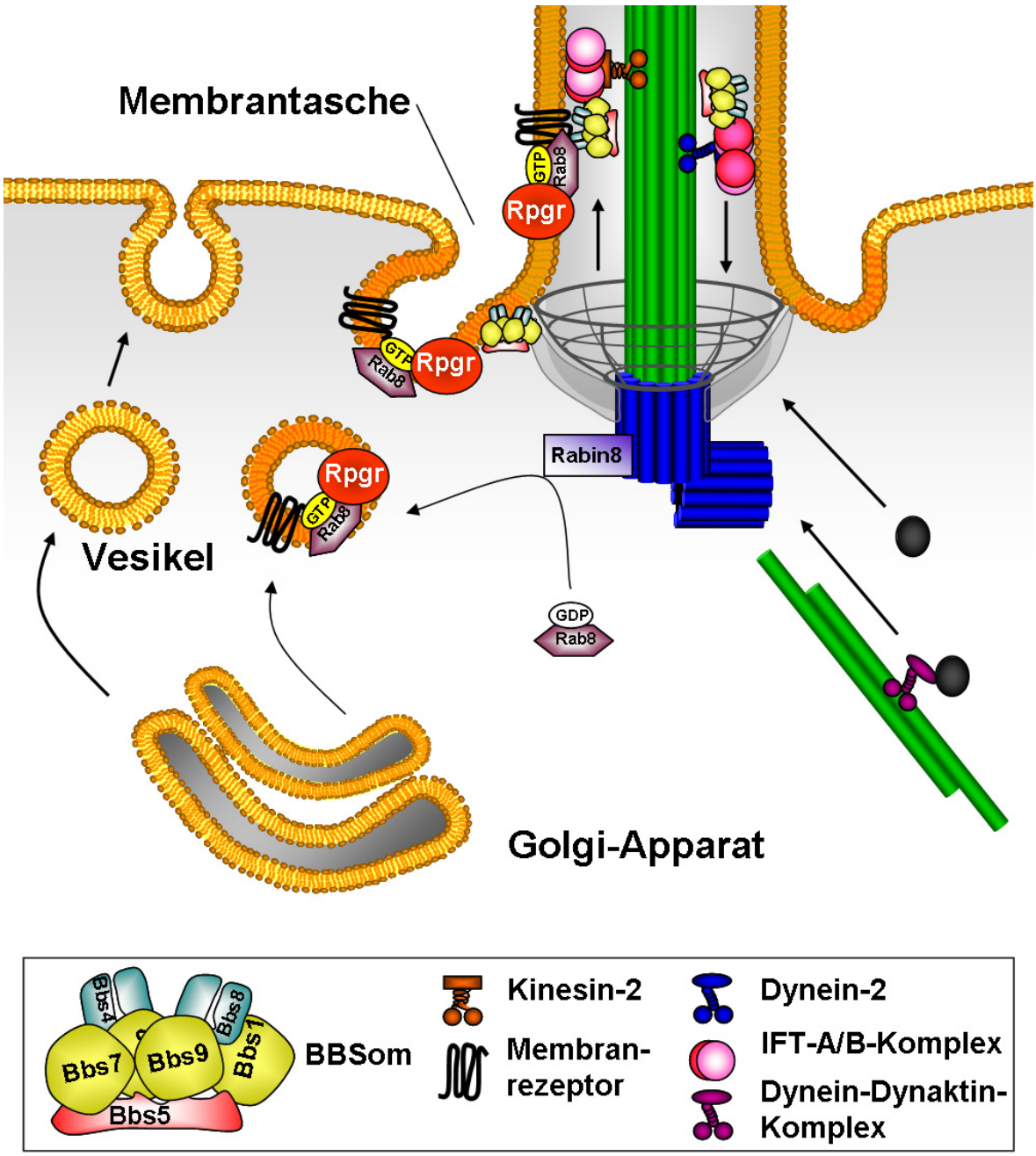

Abbildung 1.5: Extraziliäre Transportmechanismen.

Lösliche Proteine (schwarzer Kreis) könnten die Zilienbasis über die freie Diffusion erreichen oder als Fracht auf Minusende-gerichteten Mikrotubuli-Motorproteinen (Dynein-Dynaktin-Komplexe) transportiert werden. Unlösliche Proteine werden in Golgi-Vesikeln verpackt direkt zur Plasmamembran oder zur Zilienbasis befördert. Dabei katalysiert Rabin8 den GDP zu GTP Austausch und aktiviert die kleine GTPase Rab8. $Rab8^{GTP}$ hilft beim Andocken und Fusionieren der Golgi-Vesikel mit der periziliären Membran an der Zilienbasis. Das BBSom bindet an die IFT-Komplex-Maschinerie auf den Transitionsfibrillen und wandert zusammen mit $Rab8^{GTP}$ und den Frachtproteinen in die Zilie.

1.7.2 Extraziliärer Transport löslicher Proteine

Der Transport von löslichen IFT-Frachtproteinen zur Zilienbasis kann über freie Diffusion erfolgen. Analysen zeigen jedoch, dass der Transport von ziliären Proteinen dreimal schneller als freie Diffusion ist und dass für diesen zudem Mikrotubuli benötigt werden (Young *et al.*, 2000). Die Gli-Transkriptionsfaktoren, Komponenten des Zilien-assoziierten Shh-Signalwegs, beispielsweise benötigen zytoplasmatische Mikrotubuli, die zu den subdistalen Fibrillen des Basalkörpers führen, um zur Zilie zu gelangen. Hier spricht man von einem „Minusende-gerichteten Mikrotubuli-abhängigen" Transport (Kim *et al.*, 2009; Mogensen *et al.*, 2000). Das zytoplasmatische, Minusende-gerichtete Motorprotein ist Dynein, das zusammen mit Dynaktin einen Komplex (Dynein-Dynaktin-Komplex) generiert und so den Transport von Frachtproteinen bewerkstelligt (Dammermann und Merdes, 2002; Guo *et al.*, 2006; Kodani *et al.*, 2010; Quintyne und Schroer, 2002).

1.8 Diffusionsbarrieren an der Basis von Zilien

Zilien sind spezialisierte Organellen, deren Ausbildung, Erhalt sowie Funktion stark von der internen Proteinkomposition abhängt. Da sich der Gehalt an transmembranen und löslichen Proteinen von Zilien deutlich von dem des Zytoplasmas unterscheidet, ist es nahe liegend, dass selektive Barrieren und Kontrollmechanismen an der Basis von Zilien existieren müssen. Der erste Schritt zur Kontrolle wird bereits durch den extraziliären Transport generiert, der selektiert, welche Proteine sich an der Zilienbasis ansammeln dürfen. Der nächste Kontrollschritt impliziert die Entscheidung über den Eintritt von löslichen und membrangebundenen Proteinen in die Zilie. Auf diese Art und Weise hilft der Protein-Transport zwischen Zytoplasma und Zilie u.a. auch bei der Regulation Zilien-basierter Signalwege (Nachury *et al.*, 2010; Scholey und Anderson, 2006).

Für die Generierung einer ziliären Diffusionsbarriere werden unterschiedliche Zilienstrukturen verantwortlich gemacht. Eine physikalische Blockade stellen die bereits erwähnten distalen Transitionsfibrillen der Mutterzentriole dar. Elektronenmikroskopische Analysen zeigen, dass der interfibrilläre Abstand zu gering ist, um das Passagieren von Membranvesikeln zu ermöglichen (Doolin und Birge, 1966; Geimer und Melkonian, 2004; Hagiwara *et al.*, 2008; Ringo, 1967). Übereinstimmend mit dieser Vermutung werden nur selten Vesikel in Zilien detektiert (Boquist, 1970; Reese, 1965). Deshalb definiert der Punkt, an dem die Transitionsfibrillen an die Membran andocken, das Limit für die Fusion

von ziliären Vesikeln mit der periziliären Membran. Immunofluoreszenzanalysen von multiplen Zelltypen demonstrieren auch Ansammlungen von IFT-Proteinen in der Nähe der Transitionsfibrillen (Sedmak und Wolfrum, 2010, 2011; Williams *et al.*, 2011). In *Chlamydomonas* wurde Ift52 am distalen Ende der Transitionsfibrillen lokalisiert (Deane *et al.*, 2001). Auch in *C. elegans* sind IFT- und BBSom-assoziierte Proteinen in der Transitionsfibrillen-Region detektiert worden (Williams *et al.*, 2011). Zusammengenommen sind Transitionsfibrillen wichtige Andockstellen für IFT-Partikel und somit für den Transport IFT-gebundener Frachtproteine.

Septine sind kleine GTPasen, die mit der periziliären Membran in der Region der Transitionsfibrillen assoziieren (Hu *et al.*, 2010). Sie können zu Strukturen höherer Ordnung wie Filamenten, Netzen oder Ringen polymerisieren (Weirich *et al.*, 2008). Septin2 (Sept2) ist eine Komponente des Diffusionsbarrierenrings in der Basis von IMCD3-Zilien (Hu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Rate wiederkehrender Fluoreszenz nach dem Photobleichen GFP-gekoppelter, ziliärer Transmembranproteine relativ gering ist. Dies ist ein Indiz für einen langsamen Eintritt transmembraner Proteine von der periziliären Membran in die ziliäre Membran. Wurde die Proteinmenge von Sept2 jedoch herunterreguliert und somit der Septin-Ring an der Basis zerstört, kam es zu einer schnelleren, wiederkehrenden Fluoreszenz GFP-gekoppelter Transmembranproteine. Folglich hat Sept2 eine Funktion im Aufbau einer Diffusionsbarriere an der Basis von Zilien (Hu *et al.*, 2010; Hu und Nelson, 2011). Weiterhin sollen auch die Membrantaschen von speziellen Zilientypen in die Bildung des Diffusionsbarrierenrings der Septine involviert sein. Dort befinden sich die Andockstellen für Aktin-Filamente, die wiederum mit Septinen interagieren und die Formation der Septin-Ringe modulieren (Kim *et al.*, 2011; Molla-Herman *et al.*, 2010; Weirich *et al.*, 2008). Zytoplasmatische Proteine könnten die Zilie weiterhin auch über freie Diffusion erreichen. Doch dieser Transportweg ist abhängig von der Größe eines Moleküls (Hou *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2004). Wo genau die Größenbarriere der molekularen Masse liegt, ist unklar. Es konnte gezeigt werden, dass in Photorezeptorzilien Dreifach-GFP-Proteine mit einer Masse von 81kDa frei durch die Zilienbasis diffundieren können (Calvert *et al.*, 2010; Najafi *et al.*, 2012). In vielen anderen Zilientypen liegt das Ausschlusslimit bei ca. 10kDa (Kee *et al.*, 2012). Deshalb muss es auch hier eine Instanz geben, die den Ausschluss von löslichen Proteinen, die eine bestimmte molekulare Größe überschreiten, reguliert.

Ähnlich wie Transitionsfibrillen und Septine, werden ebenfalls Proteine der TZ für die Etablierung einer Diffusionsbarriere verantwortlich gemacht (Chih *et al.*, 2011; Dowdle *et al.*, 2011; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). In Säugetierzellen hat die RNAi-vermittelte Herunterregulierung vieler TZ-Proteine eine veränderte Lokalisierung zahlreicher ziliärer Proteine zur Folge. Während manche Proteine in Zilien mit dysfunktionellen TZ stärker akkumulieren, zeigen andere wiederum eine schwächere Anreicherung auf (Chih *et al.*, 2011; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Weiterhin haben auch verschiedene Komponenten der TZ unterschiedliche Funktionen. Während beispielsweise Cep290 nicht-ziliären Proteinen den Zutritt in die Zilie verwehrt, erleichtert Cc2d2a ziliären Proteinen den Eintritt (Bachmann-Gagescu *et al.*, 2011; Craige *et al.*, 2010). Da die ziliäre Membran unmittelbar durch die Y-Verbindungen mit dem Axonem der Zilie in der TZ verbunden, und das Axonemlumen mit elektronendichtem Material gefüllt ist, können zytoplasmatische Partikel lediglich zwischen den Y-Verbindungen durchdiffundieren, um das Zilienkompartiment zu erreichen (Brito *et al.*, 2012; Fisch und Dupuis-Williams, 2011). Vergleichbar mit den Transitionsfibrillen könnten auch die Y-Verbindungen den freien Eintritt von Partikeln in die Zilie hemmen (Menco, 1980). Doch im Gegensatz zur Größen-Ausschlussbarriere, die von Septinen generiert wird, könnte die TZ-Barriere eher auf das Prüfen von spezifischen CLS spezialisiert sein (Garcia-Gonzalo und Reiter, 2012).

Auch die Diffusion von Membran-gebundenen Proteinen könnte in der TZ reguliert werden. Denn genau auf dieser Höhe befinden sich zahlreiche Membranpartikel, die die ziliäre Membran kettenähnlich umschließen. Die genaue Funktion dieser Partikel ist noch unklar, doch sie könnten in die Fusion von Membranvesikeln mit der ziliären Membran involviert sein und somit den Import bzw. Export ziliärer Transmembranproteine kontrollieren.

Neuste Studien behaupten, dass es charakteristische Parallelen zwischen dem ziliären Eintritt und dem nuklearen Import gibt (Dishinger *et al.*, 2010; Kee *et al.*, 2012). Der Nuklear-Poren-Komplex (engl. nuclear pore complex, NPC) schließt Proteine, die größer als 30kDa sind, aus, während größere Proteine nur in den Kern eintreten können, wenn sie an Importine oder Exportine gebunden sind (Cook *et al.*, 2007). Importine und Exportine interagieren direkt mit Nukleoporinen, Bestandteile von Kernporen, die im Lumen ein undurchlässiges Maschennetzwerk erschaffen (Hoelz *et al.*, 2011). Die Katalyse des nukleoplasmatischen Transports von Frachtproteinen via Importinen und Exportinen wird mittels Erkennung der nuklearen Lokalisierungs- oder Exportsequenzen (NLS/NES) vermittelt. Interessanterweise müssen auch einige Proteine Importine binden, um in Zilien

akkumulieren zu dürfen (Dishinger *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2007; Hurd *et al.*, 2011). Weiterhin gibt es auch Nukleoporin-ähnliche Proteine die an der Basis von Zilien lokalisieren. Man geht davon aus, dass sie dort Nukleopore-analoge Diffusionsbarrieren generieren.

Inwieweit alle Diffusionsbarrieren parallel existieren (Septine, Transitionsfibrillen, TZ-Proteine oder Nukleoporine) oder sie gewebeabhängig zum Einsatz kommen, muss noch geklärt werden. Es ist lediglich gezeigt worden, dass Septine wahrscheinlich eine der frühsten Diffusionsbarrieren generieren, da diese die Modulation der TZ-Proteine bestimmen können. Sept2 wird beispielsweise für die Lokalisierung der Mks/B9-Modul-Proteine B9d1, Cc2d2a und Tmem231 benötigt (Chih *et al.*, 2011). Des Weiteren wird vermutet, dass Septine selbst wahrscheinlich unabhängig von TZ-Proteinen lokalisieren, da Tctn1, ein Mitglied des Mks/B9-Moduls, nicht für die Bildung eines Septin-Rings essentiell ist (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011).

Zusätzlich zu den oben genannten ziliären Exklusionsmechanismen, können auch intraziliäre Barrieren existieren, die es den Proteinen nicht erlauben, aus der Zilie zu diffundieren. In diese Kontrollmechansimen könnten TZ-Proteine, das BBSom und die IFT-Partikel involviert sein. Eine bidirektionale Kontrolle über den Eintritt und Austritt von Proteinen wurde bereits in den Nukleoporen von Zellkernen beschrieben und könnte auch in Zilien eine Rolle spielen (Lechtreck *et al.*, 2009).

1.9 Der Zilien-assoziierte Shh-Signalweg

Studien beschreiben eine zentrale Rolle von primären Zilien in der Transduktion sensorischer Signalkaskaden (Christensen *et al.*, 2007). Durch die Anreicherung von Membranrezeptoren generieren primäre Zilien ein hoch reguliertes Kompartiment, in dem Signale aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere überführt werden können. Eine dieser Kaskaden ist der speziesübergreifend konservierte Hedgehog (Hh)-Signalweg (Abbildung 1.6). Benannt wurde der Signalweg nach dem Liganden „Hedgehog“ (engl. für Igel), dessen Verlust in *Drosophila* zu igelähnlichen Larven führt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). In Säugetieren besteht die Familie der sekretierten Hh-Signalliganden aus drei Mitgliedern: Sonic-hedgehog (Shh), Indian-hedgehog (Ihh) und Desert-hedgehog (Dhh) (Echelard *et al.*, 1993). Insbesondere der Shh-Signalweg hat eine essentielle Bedeutung für die Regulation entwicklungsbiologischer Prozesse. Er ist beispielsweise in die Musterbildung zahlreicher Organismen, die Gliedmaßen- und Neuralrohrentwicklung

aber auch die Karzinogenese involviert (Ingham und McMahon, 2001; Ingham *et al.*, 2011; McMahon *et al.*, 2003; Placzek, 1995; Tabin, 1991). Weiterhin leiten drei Gli-Transkriptionsfaktoren (Gli1, Gli2 und Gli3) das Hh-Signal weiter (Denef *et al.*, 2000; Hooper und Scott, 2005; Ingham und McMahon, 2001; Zhu *et al.*, 2003). Die Gli2- und Gli3-Proteine existieren als bifunktionale Transkriptionsfaktoren und werden abhängig vom Status der Signalkaskade post-translational modifiziert. Die Ausgangsform, das Gli-Volllängenprotein (Gli2: 185kDa und Gli3: 190kDa), kann durch die Degradierung der C-terminalen Aktivatordomäne in eine verkürzte Repressorform (Gli2: 78kDa und Gli3: 83kDa) proteolytisch prozessiert werden. Die Prozessierung setzt eine Phosphorylierung von Gli durch Pka, Gsk3β und Ck1 voraus. Das hyperphosphorylierte Protein wird dann über eine $SCF^{\beta TrCP}$-Ubiquitinligase erkannt, ubiquitiniert und vom Proteasom prozessiert (Pan *et al.*, 2006; Tempe *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000; Wang und Li, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Weiterhin kann das Gli-Volllängenprotein durch eine unbekannte Modifikation in eine Aktivatorform konvertiert werden (Canettieri *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2010; Humke *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2010). Das Verhältnis beider Formen ist bei der Regulation entwicklungsbiologischer Prozesse ausschlaggebend, wobei Gli1 und Gli2 weitestgehend als Transkriptionsaktivatoren fungieren, während Gli3 überwiegend als Transkriptionsrepressor agiert (Bai *et al.*, 2004; Buttitta *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2004; McDermott *et al.*, 2005; Motoyama *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2006).

In unstimulierten Zellen kann der Rezeptor Patched1 (Ptc1), ein negativer Regulator des Signalwegs, in der Zilie detektiert werden, von wo aus er die Signalkaskade auf noch ungeklärte Weise inhibiert (Abbildung 1.6). Gleichzeitig wird der heptahelikale Transmembranrezeptor Smoothened (Smo) außerhalb der Zilien in zytoplasmatischen Vesikeln festgehalten. Infolgedessen liegt Gli in einem Komplex mit Suppressor of Fused (Sufu) in der Zilie vor, wird phosphoryliert und dann an der ziliären Basis durch das Proteasom in die Repressorform prozessiert. Die Prozessierung führt zur Dissoziation von Sufu, der Repressor wandert in den Zellkern und reprimiert die Transkription von Hh-Zielgenen.

Die Bindung des Hh-Liganden an Ptc1 führt dazu, dass beide aus der Zilie herausrekrutiert werden und Smo nicht mehr inhibiert wird (Abbildung 1.6). Folglich kann Smo in der Zilie akkumulieren und fördert dort die Anreicherung des Gli-Sufu-Komplexes in der Zilienspitze (Corbit *et al.*, 2005; Haycraft *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009; Rohatgi *et al.*, 2007). In der Zilienspitze wird Gli durch eine Modifizierung aktiviert, die wiederum in der Dissoziation von Sufu und Gli resultiert (Humke *et al.*, 2010). Das dissoziierte Gli-Protein

kann nicht mehr vom Proteasom abgebaut werden, es transloziert in den Zellkern und agiert als Transkriptionsaktivator (Chen *et al.*, 2009).

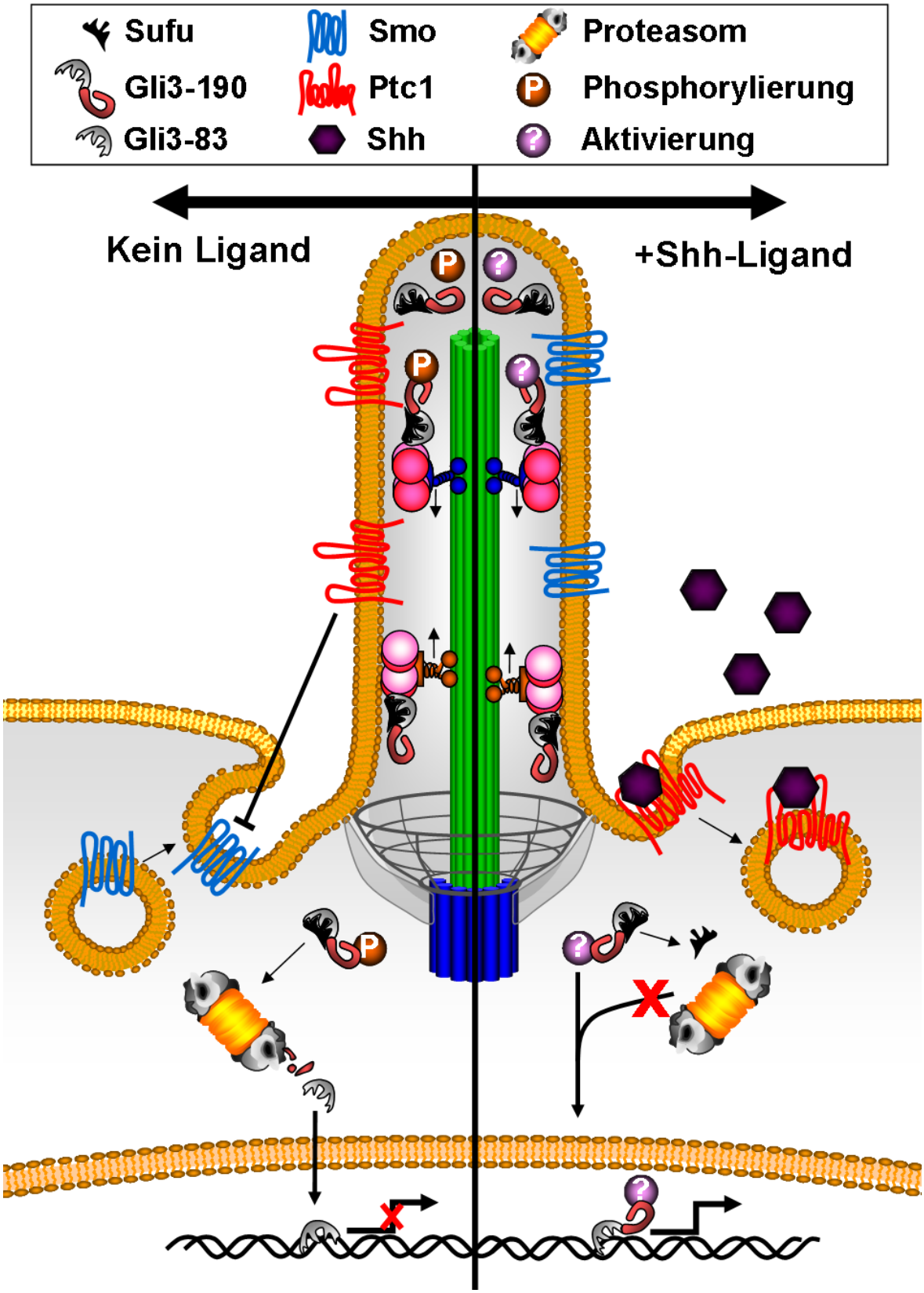

Abbildung 1.6: Der Zilien-assoziierte Shh-Signalweg.
Der Zilien-assoziierte Shh-Signalweg wird über die Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3 vermittelt. Zur vereinfachten Darstellung des Signalweg-Mechanismus wird in der Abbildung ausschließlich Gli3 dargestellt. In unstimulierten Zellen befindet sich der Rezeptor Smo in zytoplasmatischen Vesikeln und wird durch den ziliären Rezeptor Ptc1 inhibiert. Daraufhin wird Gli3-190 in einem Komplex zusammen mit Sufu wahrscheinlich in der Zilie phosphoryliert und an der Zilienbasis vom Proteasom in den Repressor (Gli3-83) proteolytisch prozessiert. Der Repressor translozierт in den Zellkern und reprimiert die Expression von Shh-Zielgenen. Bindet der Shh-Ligand an Ptc1, wird Ptc1 aus der Zilie herausrekrutiert und kann Smo nicht mehr inhibieren. Daraufhin kann Smo in der Zilie akkumulieren und fördert dort die Aktivierung des Gli3-190-Sufu-Komplexes. Durch die Aktivierung von Gli3-190 wird die Dissoziation von Sufu eingeleitet. Gli3-190 kann somit nicht mehr prozessiert werden und aktiviert im Zellkern die Expression der Shh-Zielgene.

Durch die Anreicherung von Shh-Signalproteinen in der Zilie, hat der Verlust oder Defekt dieses Kompartiments eine Störung der Kaskade zur Folge (Corbit *et al.*, 2005; Corbit *et al.*, 2008; Haycraft *et al.*, 2005; Huangfu *et al.*, 2003; Rohatgi *et al.*, 2009; Rohatgi *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2008). Daher werden auch immer mehr Moleküle identifiziert, die in die Regulation der Aktivität des Shh-Signalwegs involviert sind und gleichzeitig Zilienproteine darstellen. Ein Beispiel ist das Kinesin-verwandte Protein Kif7, welches für den anterograden Transport von Gli in der Zilie zuständig ist (Liem *et al.*, 2009). Der Transport von Shh-Signalkomponenten in und aus dem Zilium ist auch von IFT-Komplexen abhängig (Haycraft *et al.*, 2005; Houde *et al.*, 2006; Huangfu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). Bei Zilienmutanten, in denen der IFT-B-Komplex (z.B. Ift52/88/172) defekt ist, konnte eine Reduktion der Prozessierung von Gli2 und Gli3 gezeigt werden, die mit einer erhöhten Gli-Volllängenproteinmenge einhergeht. Des Weiteren scheint dort auch die Aktivierung der Gli-Proteine gestört zu sein (Haycraft *et al.*, 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Huangfu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; May *et al.*, 2005).
Auch der Defekt des retrograden IFTs scheint sich negativ auf die Gli-Repressor- und Gli-Aktivatormenge auszuwirken (May *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2008). Deshalb wird vermutet, dass Zilienkomponenten in einen molekularen Mechanismus involviert sind, der für die Bildung des Gli-Repressors und -Aktivators zuständig ist (Sasai und Briscoe, 2012). Im Gegensatz dazu steht jedoch ein Membran-assoziiertes Protein der ARL-Familie von kleinen GTPasen namens Arl13b. Die Deletion von *Arl13b* führt in der Hennin-Mausmutante zu einer Verkürzung von Zilien und einem defekten Axonem, was auf einen

gestörten anterograden Transport hindeutet (Caspary *et al.*, 2007; Horner und Caspary, 2011). Der Verlust von Arl13b zeigt jedoch, dass die Prozessierung und Aktivität des Gli3-Repressors trotz der gestörten Ziliogenese normal ist; lediglich die Generierung des Gli3-Aktivators ist stark eingeschränkt. Wie genau der IFT und die Zilie in die Prozessierung bzw. Aktivierung der Gli-Proteine involviert sind, muss noch aufgeklärt werden.

Des Weiteren sind auch TZ-Proteine wie Tctn1-3, Mks1 oder Ftm für die Shh-Signalkaskade essentiell (Gerhardt, 2010; Reiter und Skarnes, 2006; Sang *et al.*, 2011; Vierkotten *et al.*, 2007; Weatherbee *et al.*, 2009). Zilien benötigen eine intakte TZ, die reguliert, wann Shh-Signalproteine in der Zilie akkumulieren dürfen und mit anderen Komponenten durch Protein-Protein-Interaktionen in Kontakt treten (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Der extrazelluläre, selektive Vesikeltransport ist ebenso bedeutsam für den Shh-Signalweg, da jeder Rezeptor zu einem bestimmten Zeitpunkt zur Zilienbasis transportiert werden muss, um danach in der Zilie lokalisieren zu können (Chen *et al.*, 2009; Corbit *et al.*, 2005; Haycraft *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009; Rohatgi *et al.*, 2007).

Neben dem Shh-Signalweg werden viele andere Signalkaskaden mit primären Zilien assoziiert: kanonischer und nicht kanonischer Wnt-Signalweg (Cano *et al.*, 2004; Corbit *et al.*, 2008; Oishi *et al.*, 2006; Otto *et al.*, 2003), Pdgfrα-Signalweg (Christensen *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2005), Notch-Signalkaskade (Ezratty *et al.*, 2011), Calcium-Signaltransduktion (Nauli *et al.*, 2003; Shiba *et al.*, 2005) und der FGF-Signalweg (Neugebauer *et al.*, 2009). Eine Signalkaskade, deren Verbindung zur Zilie noch ungeklärt ist, stellt das proteindegradierende Ubiquitin-Proteasom-System dar.

1.10 Mechanismen des Proteinabbaus

Zellen bedienen sich sowohl extra- als auch intrazellulärer Mechanismen, um Proteine abzubauen. Ein bekannter extrazellulärer Signalweg beinhaltet Verdauungsproteasen, die im Darm sitzen. Sie spalten Proteine in einzelne Aminosäuren und Di- bzw. Tripeptide, die dann über die Darmwand ins Blut aufgenommen werden. Intrazelluläre Abbaumechanismen umfassen Lysosomen und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Exogene Proteine, die aus dem extrazellulären Umfeld aufgenommen wurden, werden meistens über Lysosomen abgebaut. Dabei handelt es sich um Zellorganellen, deren saures, inneres Milieu zahlreiche Hydrolasen enthält, die u.a. Proteine nicht-spezifisch degradieren. Die selektive Degradierung von 80-90% der zelleigenen, zytoplasmatischen und nuklearen Proteine wird über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) reguliert (Coux

et al., 1996; Sorokin *et al.*, 2009). In diesem Signalweg wird aktiviertes Ubiquitin über eine E1-E2-E3-Kaskade an ein Substrat transferiert und dann von Proteasomen degradiert (Ye und Rape, 2009). Zwei Klassen von Proteinen stellen die Substrate des UPS dar. (1) Regulatorische Substrate, die während physiologischer Prozesse programmiert ubiquitiniert werden und (2) Substrate die in der Proteinqualitätskontrolle durchgefallen sind, weil sie geschädigt, falsch gefaltet, oxidiert oder in unzweckmäßige Komplexe bzw. Aggregate involviert sind (Schubert *et al.*, 2000; Vabulas und Hartl, 2005). Die regulatorische Ubiquitinierung von Proteinen resultiert entweder in einer vollständigen Degradierung des betreffenden Substrats, womit seine Funktion eliminiert wird (z.B. p-β-Catenin), oder in einer Prozessierung, was die limitierte Proteolyse von Proteinen beschreibt (z.B. Gli-Proteine). Somit können Proteasomen nicht nur über die intrazelluläre Proteinmenge entscheiden, sondern auch signifikant die Funktion von Proteinen beeinflussen.

1.10.1 Der Proteasom-Aufbau

Das Proteasom ist die größte ATP-abhängige Protease in Eukaryoten, doch limitiertes Wissen über den Aufbau begrenzt das Verständnis über die mechanistische Aktivität. Proteasomen befinden sich sowohl im Zytoplasma als auch im Kern von allen eukaryotischen Zellen und machen 1% der Gesamtproteinmenge einer Zelle aus (Tanaka *et al.*, 1986). Das 26S-Proteasom ist eine massive Multiproteinmaschinerie von ungefähr 1,5MDa. Es besteht aus 32 verschiedenen Proteinen, die zusammen die tonnenförmige, proteolytisch aktive 20S-Untereinheit (20S-Kernpartikel) bilden, an die sich eine oder zwei regulatorische 19S-Untereinheiten, so genannte „Cap"-Komplexe anlagern können (Abbildung 1.7). Die 20S-Untereinheit besteht aus einer gestapelten Anordnung von vier heptameren Ringen (Groll *et al.*, 1997). Die externen zwei Ringe bestehen jeweils aus sieben verschiedenen α-Untereinheiten (Psma1-7), während die zwei internen Ringe durch sieben verschiedene β-Untereinheiten (Psmb1-4,8-10) generiert werden (Coux *et al.*, 1996). Das 20S-Kernpartikel enthält multikatalytische Proteasen, deren aktive Seiten in der inneren Kammer des Kern-Zylinders eingeschlossen sind.

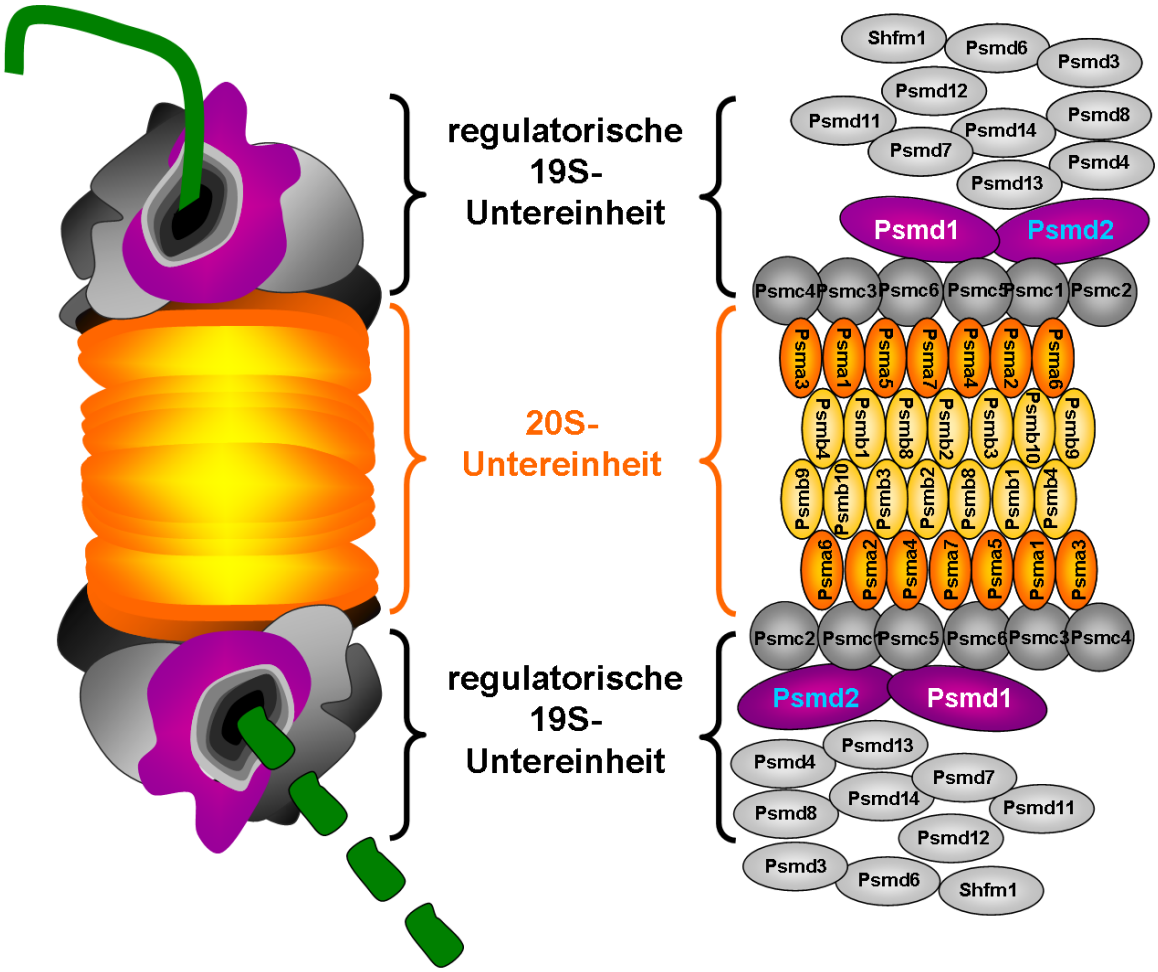

Abbildung 1.7: 26S-Proteasom-Aufbau.
Das 26S-Proteasom setzt sich aus dem katalytischen 20S-Kernpartikel und zwei flankierenden regulatorischen 19S-Untereinheiten zusammen. Die 20S-Untereinheit zeigt eine zylinderförmige Anordnung von vier heptameren Ringen, wobei je sieben α- und β-Untereinheiten einen Ring bilden. Nur drei β-Untereinheiten (Psmb8-10) besitzen eine proteolytische Aktivität, die dem Proteasom Trypsin-, Chemotrypsin- und Caspase-ähnliche Fähigkeiten verleiht. Die 19S-Untereinheit kann in zwei Subkomplexe unterteilt werden: einen Basis-Komplex (aus sechs ATPasen (Psmc1-6) und drei nicht-ATPasen (Psmd1, 2 und 4)) und einen Deckel-Komplex (aus neun nicht-ATPasen (Psmd3, 6-8, 11-14 und Shfm1)).

Die 19S-Untereinheit des Proteasoms ist in Säugetieren aus 18 verschiedenen Proteinen konstruiert, die zusammen ein molekulares Gewicht von 900kDa haben und in zwei Subkomplexe unterteilt werden können: Basis (engl. base) und Deckel (engl. lid). Der Deckel-Komplex besteht aus neun nicht-ATPasen (Psmd3, 6-8, 11-14 und Shfm1), inklusive des deubiquitinierenden Proteins (DUB) Psmd14, dessen Aktivität essentiell für eine effiziente Substrat-Degradierung ist (Verma *et al.*, 2002; Yao und Cohen, 2002). Der Basis-Komplex enthält sechs ATPasen (Psmc1-6), die einen hetero-hexamerischen Ring

ausbilden und den molekularen Motor des Proteasoms darstellen (Tomko *et al.*, 2010). Weiterhin befinden sich in der Basis der 19S-Untereinheit auch drei nicht-ATPasen: Psmd1, Psmd2 und Psmd4. Die Rekrutierung ubiquitinierter Proteine erfolgt entweder mittels des intrinsischen Ubiquitin-Rezeptors Psmd4 oder über einen speziellen „Shutteling"-Mechanismus, bei dem die Rezeptoren Rad23, Dsk2 und Ddi1 durch Psmd2 zum Proteasom rekrutiert werden (Elsasser *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2011; Leggett *et al.*, 2002).

1.10.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der selektive Proteinabbau durch das UPS wird durch eine spezielle Markierung der Substrate gewährleistet. Die Markierung übernehmen Ubiquitine, hoch konservierte und ubiquitär exprimierte Moleküle, die an Proteine reversibel und post-translational konjugiert werden können. Die Ubiquitinierung eines Zielsubstrats erfolgt über ein hierarchisches 3-Stufen System (Abbildung 1.8). Zunächst wird Ubiquitin (Ub) unter ATP-Verbrauch von einem Ub-aktivierenden E1-Enzym gebunden. Infolgedessen kann das aktivierte Ub auf ein Ub-konjugierendes E2-Enzym transferiert werden. Das E2-Enzym wiederum überträgt das aktivierte Ub auf eine substratspezifische E3-Ligase. Es folgt die kovalente Bindung (Isopeptid-Bindung) der Seitenkette eines Substrat-Lysins mit einem Ub-Glycin. Nachdem die erste Ub-Ligation an ein Substrat erfolgt ist, fügt die E3-Ligase sequentiell immer weitere Ub-Einheiten über eine Isopeptidbindung an das Substrat an, bis eine Polyubiquitinkette entsteht (Hershko und Ciechanover, 1998).

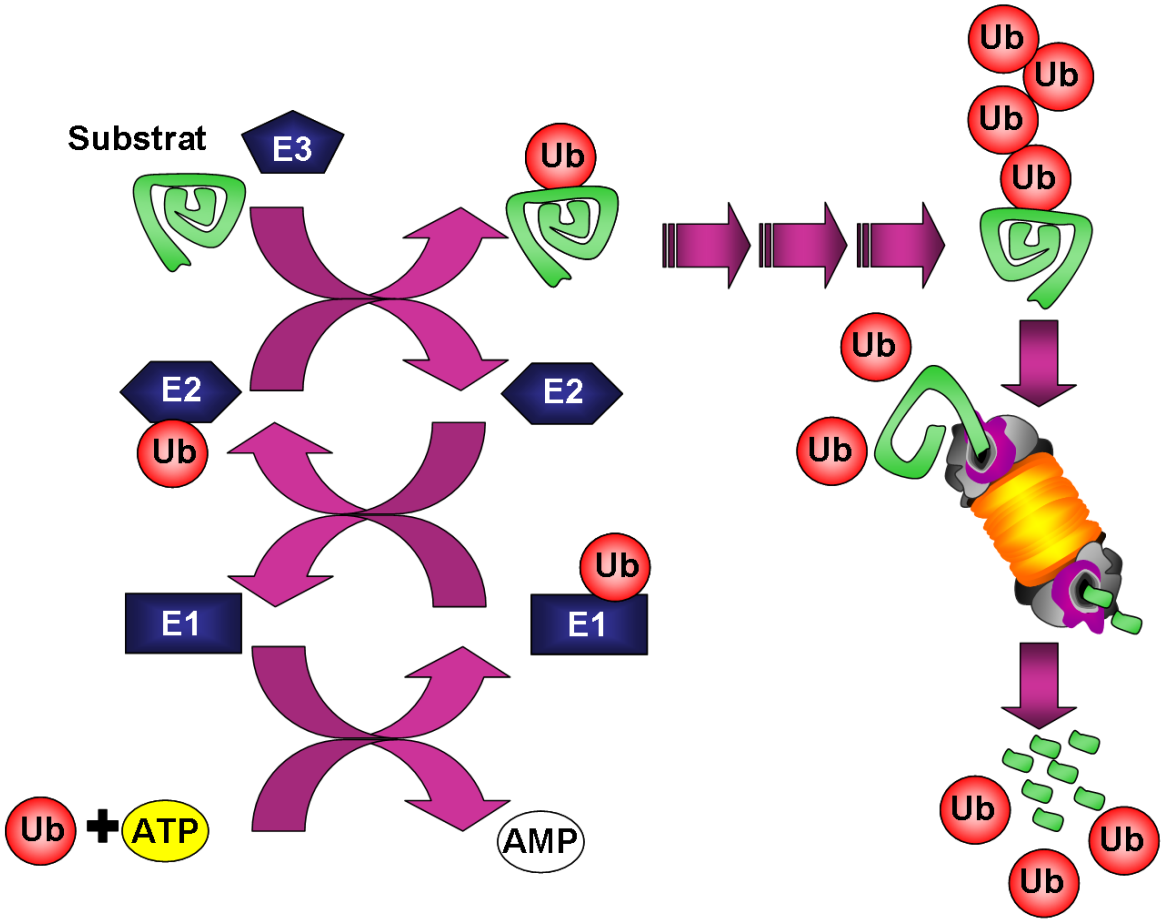

Abbildung 1.8: Ubiquitin-Proteasom-System.
Das UPS beginnt mit der 3-stufigen Polyubiquitinierung eines Substrats. Zunächst kann das E1-Enzym unter ATP-Verbrauch Ubiquitin (Ub) aktivieren. Es folgt die Transferierung des aktivierten Ubiquitins auf ein Ub-konjugierendes E2-Enzym. Dieses überträgt das aktivierte Ubiquitin auf eine substratspezifische E3-Ligase, die wiederum Ubiquitin kovalent an ein Substrat bindet. Mehrere gebundene Ubiquitine bilden eine Polyubiquitinkette, die vom Proteasom durch den Ubiquitin-Rezeptor erkannt wird. Ein DUB übernimmt das Recycling der Ubiquitine, während das Substrat durch die 19S-Untereinheit entfaltet und in das 20S-Kernpartikel transloziert wird. Dort wird das Substrat zu kleinen Peptiden hydrolysiert.

Ein polyubiquitiniertes Substrat wird mit hoher Affinität über einen Ubiquitin-Rezeptor (z.B. Psmd4) der 19S-Untereinheit erkannt und gebunden. Das DUB Psmd14 der 19S-Untereinheit sorgt noch vor dem Eintritt des Proteins in das 20S-Kernpartikel für die Dekonjugation der Polyubiquitine in Monoubiquitine (Verma *et al.*, 2002; Yao und Cohen, 2002). Ubiquitin per se lokalisiert somit nie im Proteasom. Es wird recycelt und kann später wieder an neue Proteine konjugiert werden. Eine Polyubiquitinkette muss aus mindestens vier Ubiquitinresten bestehen, damit es zur Degradierung eines Proteins kommt. Erst die Länge einer Tetra-Ubiquitin-Kette ermöglicht eine simultane Verbindung

zwischen dem Ubiquitin-Rezeptor und einem DUB und führt zum unmittelbaren Abbau (Lander *et al.*, 2012; Thrower *et al.*, 2000). DUBs können auch kurze Polyubiquitinketten von Proteinen entfernen und sie so vor einer Degradierung schützen (Eytan *et al.*, 1993; Guterman und Glickman, 2004; Hanna *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 1997; Thrower *et al.*, 2000).

Die ATPasen des Basis-Komplexes der 19S-Untereinheit nutzen die Energie einer ATP-Bindung und Hydrolyse, um eine Zug-Kraft zu erzeugen, die die Proteine anzieht, entfaltet und durch eine enge, zentrale Pore ins Innere des 20S-Kernpartikels transloziert. Der Eintritt in die katalytische Kernkomponente ist lediglich entfalteten Proteinen vorbehalten, da die Öffnung zu klein für tertiärstrukturierte Proteine ist. Die Anwesenheit von ATP bewirkt, dass die C-Termini der ATPasen direkt mit dem α-Untereinheitenring des Kernpartikels in Kontakt treten, diesen öffnen und somit den Substrateintritt erleichtern (da Fonseca und Morris, 2008; Gillette *et al.*, 2008; Rabl *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2007). Im 20S-Kernkomplex werden Proteine zu kleinen Peptiden von 3-25 Aminosäuren hydrolysiert, die dann am anderen Ende des Proteasoms wieder entlassen werden (Glickman und Ciechanover, 2002; Kisselev *et al.*, 1998; Kisselev *et al.*, 1999). Dabei haben drei der sieben β-Untereinheiten (Psmb8-10) des 20S-Kernpartikels eine Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-ähnliche, proteolytische Aktivität (Dick *et al.*, 1998; Groll *et al.*, 1999; Heinemeyer *et al.*, 1997; Hilt und Wolf, 1996; Jager *et al.*, 1999; Orlowski *et al.*, 1993; Orlowski und Wilk, 2000).

Das Proteasom kontrolliert unzählige zelluläre Prozesse, wie die Zellzykluskontrolle und -progression (Abbau von Zyklinen), DNA-Reparatur, Immunantwort, Apoptose und Signaltransduktion (Degradierung bzw. Prozessierung von Transkriptionsfaktoren) (Coux *et al.*, 1996; Finley, 2009; Schwartz und Ciechanover, 1999). Vor allem durch die Zellzykluskontrolle ist das Proteasom als Ziel für Therapieansätze in der Bekämpfung von Krebs in den Fokus geraten. Durch das Einsetzen von proteasominhibierenden Substanzen versucht man das Wachstum von Tumoren zu unterdrücken. MG132 ist ein potenter, zellpermeabler und reversibler Proteasominhibitor der zur Gruppe der Peptidaldehyde gehört. Es inhibiert die Chemotrypsin-ähnliche Aktivität des 26S-Proteasoms (Lee und Goldberg, 1998).

1.11 Ziel dieser Arbeit

Die Dysfunktion oder der Verlust ziliärer Proteine führt zu einer Vielzahl von menschlichen Erkrankungen, die man zusammenfassend als „Ziliopathien“ bezeichnet. Einige dieser Proteine lokalisieren in organisierten Multiproteinkomplexen (Nphp1-4-8-Modul, Nphp5-6-Modul, Inversin-Kompartiment und Mks/B9-Modul) in der TZ von Zilien. Studien zeigen, dass Ftm die Lokalisierung aller Module in der TZ von *C. elegans*-Zilien beeinflusst (Williams *et al.*, 2011). Ob Ftm auch in Säugetierzilien an der Spitze der TZ-Assemblierungshierarchie agiert und welche Konsequenzen die Ftm-Defizienz für die Funktion der TZ hat, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Weiterhin führt der Verlust des Ftm-Proteins zu einer Störung vieler Zilien-assoziierter Signalwege u.a. auch der Shh-Signalkaskade (Gerhardt, 2010; Vierkotten *et al.*, 2007). In *Ftm*-negativen Embryonen kann eine erhöhte Proteinmenge der Shh-Signalwegskomponente Gli3-190 detektiert werden (Vierkotten *et al.*, 2007). Die molekularen Ursachen der Proteinmengenzunahme sind noch ungeklärt und sollen hier aufgeschlüsselt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die allgemein verwendeten Chemikalien, Zellkultur-Utensilien und Enzyme wurden alle, wenn nicht anders gekennzeichnet, von folgenden Firmen bezogen:
Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (NEB; Schwalbach, Deutschland), Promega (Heidelberg, Deutschland), Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland), Riedel de Haen (Seelze, Deutschland), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).
Soweit erforderlich, wurden die verwendeten Lösungen, Gefäße und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 30 min. oder durch Filtrieren sterilisiert. Ferner wurden sämtliche im Labor verrichteten Arbeiten mit hochreinem Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage angesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Geräte und Verbrauchsmaterialien, die in den folgenden Abschnitten nicht genannt werden, sind standardmäßig in einem molekularbiologischen Labor enthalten.

2.1 Tierexperimente

2.1.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung und -zucht der in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurde in der Tierversuchsanlage der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.1.2 Isolation definierter Embryonalstadien

Die Verpaarung geschlechtsreifer Mäuse fand im Käfig mit jeweils zwei Weibchen und einem Männchen statt. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf die Präsenz eines Vaginalpfropfens, welcher sich bei einer erfolgreichen Befruchtung bildet, hin untersucht. Wurde eine Befruchtung bis 12 Uhr Mittag festgestellt, definierte das den Embryonaltag (E) 0.5 und die Tiere wurden wieder getrennt. Die schwangeren Weibchen wurden bis zum Erreichen des gewünschten Embryonalstadiums gehalten, danach durch zervikale

Dislokation getötet und ihre Uteri freipräpariert. Die Isolation der Embryonen mitsamt embryonaler Membranen erfolgte unter dem Stereomikroskop in eiskaltem PBS.

Verwendete Lösungen:

PBS
4 mM $NaH_2PO_4*H_2O$
16 mM $Na_2HPO_4*2H_2O$
150 mM NaCl
pH 7,3
autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.

2.1.3 Genotypisierung von Embryonen

Mit Hilfe eines PCR-Nachweises wurden Embryonen eines definierten Stadiums genotypisiert. Dazu wurde die genomische DNA aus den Dottersäcken oder Schwanzspitzen isoliert (siehe 2.3.2 bis 2.3.4) und anschließend in einer Genotypisierungs-PCR (siehe 2.3.7) eingesetzt. So konnten wildtypische, *Ftm*-heterozygot mutante und *Ftm*-homozygot mutante Embryonen ermittelt werden.

2.2 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt (Heraeus HeraSafe 12). Die Zellen wurden in Zellkulturschalen der Firmen Falcon, TPP und Nunc in einem begasten Brutschrank (Heraeus HeraCell) bei 5% (v/v) CO_2 und 37°C kultiviert und das Zellkulturmedium alle 2 bis 3 Tage erneuert.

2.2.1 Primärzellkulturen und Zelllinien

2.2.1.1 Isolation und Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten

Embryonale Mausfibroblasten (engl. mouse embryonic fibroblasts, MEFs) sind Primärzellkulturen, die aus Embryonen isoliert werden und somit eine Mischung aus allen embryonalen Fibroblastenzellen darstellen. Zur Herstellung von MEFs wurden Embryonen des Stadiums E12.5 aus den Uteri von Mäusen präpariert, ihr Kopf und die Innereien entfernt (um überwiegend Fibroblasten zu erhalten) und der Restembryo in sterilem PBS gewaschen. Danach wurde der Embryo in 10 cm-Zellkulturschalen überführt, mit 2 ml Trypsin/EDTA versetzt und mit einer sterilen Schere in ca. 1 mm große Gewebestücke

zerkleinert. Die generierten Stücke wurden mit dem Stempel einer 1 ml-Spritze zerdrückt und 10-mal durch eine Pipette hoch- und runterpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min. bei 37°C wurde der Pipettiervorgang inklusive 10-minütiger Inkubation zweimalig wiederholt. Zum Schluss wurde die homogene Zellsuspension in der Zellkulturschale mit 10 ml Zellkulturmedium aufgefüllt und zum Wachsen in den Brutschrank (Heraeus HeraCell) gestellt. Nach dem Erreichen der Konfluenz (ca. 3 Tage später) wurden die Zellen von der 10 cm- auf eine 15 cm-Zellkulturschale passagiert und dann weiter in Kultur gehalten, oder zur späteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Zu diesem Zeitpunkt wurde die erste Passage definiert.

2.2.1.2 Zelllinien

NIH3T3-Zellen (immortile, embryonale Maus-Fibroblasten-Zelllinie) (Jainchill *et al.*, 1969) wurden von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. HEK293T-Zellen (humane, embryonale Nierenzelllinie, engl. human embryonic kidney cell line) stammen aus dem Cell line Service (CLS) und IMCD3-Zellen (epitheliale Nierenzelllinie, engl. mouse inner medullary collecting duct cell line) wurden von Sophie Saunier* bezogen.

Verwendete Materialien:

NIH3T3-Zellen	DSMZ #ACC 59
HEK293T-Zellen	CLS #300192
IMCD3-Zellen	Sophie Saunier*

*Universität Paris-Descartes, Frankreich

2.2.2 Passagieren von Zellen

Erreichten Zellen ihren konfluenten Zustand, wurden sie passagiert. Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Trypsin/EDTA (2 ml bei 10 cm-Zellkulturschalen, 5 ml bei 15 cm-Zellkulturschalen) und eine dreiminütige Inkubation bei 37°C. Falls die Zellen sich nicht direkt von der Zellkulturschale lösten, wurden sie vorsichtig geschüttelt, bis unter dem Mikroskop eine gelöste Zellsuspension erkennbar war. Zum Abstoppen des Trypsinierungsvorgangs wurde das 3-fache Volumen an Zellkulturmedium hinzugegeben

und die Zellsuspension für 5 min. zentrifugiert (800 Upm, Heraeus Megafuge 1.0). Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung erneut auf die Zellkulturplatten ausgesät. Nach jedem Umsetzen der Zellen wurde die Passage erhöht. Alle für Versuchszwecke verwendeten MEFs befanden sich zwischen der fünften und siebten Passage.

2.2.3 Behandlung von MEFs mit MG132

Zur Proteasominhibierung in MEFs wurden die Zellen für 6 Stunden mit 20 µM MG132, einem potenten Proteasominhibitor, oder 0,1% DMSO (Kontrolle) behandelt. Nach der Behandlung erfolgte eine Immunofluoreszenzfärbung (siehe 2.5.2.2).

Verwendete Lösungen:

MG132	gelöst in DMSO	Enzo life Sciences #PI-102-0005
DMSO		Merck #1029500500

2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die konfluenten Zellkulturen mit PBS gewaschen und mit Trypsin vom Zellkulturschalenboden abgelöst. Der Trypsinierungsvorgang wurde mit frischem Zellkulturmedium abgestoppt, die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min.; 800 Upm, Heraeus Megafuge 1.0). Nach dem Abnehmen des Überstands wurde das entstandene Zellpellet in 500 µl Zellkulturmedium resuspendiert und mit 500 µl eiskaltem Einfriermedium vermischt. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Zellen zunächst rasch im 37°C-Wasserbad aufgetaut. Das aufgetaute Einfriermedium, inklusive der Zellen, wurde in 5 ml Zellkulturmedium überführt und für 5 min. bei 800 Upm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0). Weiterhin wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet im frischen Zellkulturmedium gelöst und die Lösung auf eine 10 cm-Zellkulturschale transferiert.

2.2.5 Kultivierung von Zellen auf Deckgläschen

Um eine Immunofluoreszenzfärbung durchführen zu können, mussten die Zellen einige Tage zuvor auf Deckgläschen umgesetzt werden. Dazu wurde in jedes Loch einer 24-Loch-Platte unter der Sterilbank ein autoklaviertes Deckgläschen gelegt und die Zellsuspension mit der entsprechenden Zelldichte zugeführt. Zur Induktion der Ziliogenese wurden die Zellen in einer Dichte von 2,5 x 10^4 Zellen/cm^2 ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz wachsen gelassen. Danach folgte ein Serumentzug von 24 Stunden, bei dem das Zellkulturmedium der Zellen durch Zellkulturmedium mit 0,5% FCS (engl. für fötales Kälberserum) ersetzt wurde.

Verwendete Lösungen:

Trypsin/EDTA		GibcoBRL #45300-027
Zellkulturmedium	500 ml DMEM	GibcoBRL #41965-039
(für MEFs, NIH3T3-	6 ml Penicillin/Streptomycin (10-30 U/ml)	GibcoBRL #14140-114
und HEK293T-Zellen)	6 ml L-Glutamin (200 mM)	GibcoBRL #14140-114
	6 ml NEAA (100 mM)	GibcoBRL #11140-035
	6 ml Na-Pyruvat (100 mM)	GibcoBRL #11360-039
	50 ml bzw. 2,5 ml (für den Serumentzug) fötales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert 50 min., 56°C	PAA Laboratories #A15-080
Zellkulturmedium	500 ml DMEM	GibcoBRL #11320-074
(für IMCD3-Zellen)	6 ml Penicillin/Streptomycin (10-30 U/ml)	GibcoBRL #14140-114
	50 ml bzw. 2,5 ml (für den Serumentzug) fötales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert 50 min., 56°C	PAA Laboratories #A15-080
Einfriermedium	80% fötales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert 50 min., 56°C	PAA Laboratories #A15-080
(2-fach konzentriert)	20% DMSO	Merck #1029500500

2.2.6 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte in einer Suspension erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden die trypsinierten Zellen (siehe 2.2.2) gründlich im Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl in 4 Großquadraten der Zählkammer bestimmt. Mittels folgender Formel wurde die Zelldichte berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times 10^4$$

2.2.7 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen

Um DNA in eukaryotische Zellen wie MEFs, NIH3T3- oder HEK293T-Zellen einzubringen, wurde das PolyFect-Transfektionsreagenz von Qiagen nach den Vorgaben des Herstellers benutzt. Dabei bildet die Plasmid-DNA zusammen mit dem PolyFect-Reagenz einen Komplex, der an Zelloberflächen-gebundene Rezeptoren bindet und so in die Zelle geschleust wird. Der DNA-PolyFect-Komplex ist im Zellinneren vor der Degradierung durch Lysosomen geschützt, die Plasmid-DNA wandert in den Zellkern und wird dort exprimiert.

Verwendete Lösungen:

PolyFect Transfection Reagent	Qiagen #301107

2.3 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Als Nukleinsäuren werden sowohl Desoxyribonukleinsäuren (engl. deoxy ribonucleic acid, DNA) als auch Ribonukleinsäuren (engl. ribonucleic acid, RNA) bezeichnet. Wird mit Nukleinsäuren gearbeitet, sollte auf eine zügige Durchführung bei 4°C geachtet werden, da vor allem RNA schnell durch RNAsen degradiert wird.

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die angewendeten Präparationen basieren auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983; Birnboim und Doly, 1979).

2.3.1.1 Plasmid-Mini-Isolation

Die auf Selektionsplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit Hilfe einer autoklavierten Pipettenspitze von der Platte gepickt und in ein Glasröhrchen mit 5 ml Selektionsmedium überführt. Die Zellsuspension rotierte bei 37°C über Nacht auf einem Drehrad. 2 ml der Übernachtkultur wurden in ein Eppendorf-Gefäß abgenommen und die Bakterien für 3 min. bei 6000 Upm pelletiert (Eppendorf 5415D). Das Plasmid-Mini-Kit

der Firma Qiagen GmbH wurde für die Isolation der Plasmid-DNA verwendet. Zunächst wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl eiskaltem P1-Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl P2-Puffer, der die Bakterien alkalisch lysierte, und eine anschließende Neutralisation durch 150 µl des eiskalten P3-Puffers für 10 min. auf Eis. Weiterhin wurde der entstandene, proteinhaltige Niederschlag pelletiert (10 min.; 13000 Upm, Eppendorf 5415D) und der klare, plasmidhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Durch die Zugabe des 0,7-fachen Volumens (350 µl) Isopropanol konnte die Plasmid-DNA präzipitiert werden. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min.; 13000 Upm, Eppendorf 5415D) und die Abnahme des Überstandes. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurden mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und zentrifugiert (5 min.; 13000 Upm, Eppendorf 5415D). Schließlich wurde der Überstand erneut abgenommen, die aufgereinigte Plasmid-DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 25 µl TE-Puffer resuspendiert. Um zu kontrollieren, ob die Plasmid-Isolation erfolgreich war, wurden 2 µl der DNA-Suspension restriktionsenzymatisch verdaut (siehe 2.4.1) und die generierten DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.4.2). Wurde das korrekte Plasmid nachgewiesen, erfolgte die Animpfung einer erneuten Bakterienkultur zur Plasmid-Midi/Maxi-Isolation (siehe 2.3.1.2) mit 100 µl aus der verbliebenen, ursprünglichen Bakteriensuspension.

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in ddH_2O	
Isopropanol	abs.	
LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in ddH_2O autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	 Applichem #A1553 Applichem #A1552
Puffer P1	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0	
Puffer P2	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS	
Puffer P3	3 M Kaliumacetat pH 4,8 mit Eisessig	

Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium	Applichem #A0839
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0	

2.3.1.2 Plasmid-Midi/Maxi-Isolation

Um reinere und größere Mengen (100 µg bis 1 mg) Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurden die „QIAGEN Plasmid Kits“ („Midi“/ „Maxi“) gemäß den Protokollen des Herstellers verwendet. In der Plasmid-Maxi-Isolation wurden 100 ml Selektionsmedium mit 100 µl Bakteriensuspension aus der zuvor analysierten und aufgehobenen Plasmid-Mini-Isolation (siehe 2.3.1.1) angeimpft. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C auf einem Plattformschüttler (160 Upm, Heidolph Polymax 1040). Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension für 15 min. bei 6000 Upm zentrifugiert (Heraeus, Megafuge 1.0R), der Überstand zum Autoklavieren verworfen und das Bakterienpellet entweder weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren. Fortführend wurde das Bakterienpellet in 4 ml („Midi“) oder 10 ml („Maxi“) eiskaltem P1-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Es folgte die alkalische Lyse der Bakterien durch die Zugabe von 10 ml P2-Puffer und die anschließende Neutralisation mit 10 ml eiskaltem P3-Puffer. Die Suspension wurde 15 min. („Midi“) bzw. 20 min. („Maxi“) bei 4°C inkubiert und danach für 15 min. bei 4°C und 6000 Upm zentrifugiert (Heraeus, Megafuge 1.0R). Als Nächstes wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Zur gleichen Zeit konnte eine Qiagen-Säule mit 4 ml („Midi“) bzw. 10 ml („Maxi“) QBT-Puffer äquilibriert und der abzentrifugierte Überstand langsam auf die Säule gegeben werden. Nachdem die DNA von der Säulenmembran gebunden wurde, folgten zwei Waschschritte mit jeweils 10 ml („Midi“) bzw. 30 ml („Maxi“) QC-Puffer. Durch die Zugabe von 5 ml („Midi“) bzw. 15 ml („Maxi“) QF-Puffer konnte die DNA von der Säulenmembran eluiert und in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Weiterhin wurde die Lösung mit 3,5 ml („Midi“) bzw. 10,5 ml („Maxi“) Isopropanol versetzt, was die Präzipitation der DNA auslöste. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min. (4°C; 6000 Upm, Heraeus, Megafuge 1.0R) und die Verwerfung des Überstandes. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml („Midi“) bzw. 10 ml („Maxi“) Ethanol (70%) versetzt, gewaschen und abermals zentrifugiert (10 min.; 4°C; 6000 Upm, Heraeus, Megafuge 1.0R). Nach der Abnahme des Überstandes wurde das

aufgereinigte DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt (siehe 2.3.6). Um zu kontrollieren, ob die Plasmid-Isolation erfolgreich war, wurden 2 µl der DNA-Suspension restriktionsenzymatisch verdaut (siehe 2.4.1) und die generierten DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.4.2).

Verwendete Lösungen und Materialien:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in ddH_2O	
Isopropanol	abs.	
LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in ddH_2O autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	 Applichem #A1553 Applichem #A1552
Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium	Applichem #A0839
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0	
QIAGEN Plasmid Kit „Midi“		Qiagen #12145
QIAGEN Plasmid Kit „Maxi“		Qiagen #12163

2.3.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Dottersäcken von Mausembryonen

Um DNA aus Dottersäcken von Mausembryonen zu extrahieren, wurden 200 µl Dottersack-Puffer und 10 µl Proteinase K in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die extraembryonalen Membranen darin über Nacht bei 56°C in einem Wärmebad (Memmert) inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen zwingend notwendigen Vorgang, da in dem verwendeten Dottersack-Puffer EDTA und SDS enthalten sind, die die Funktion der DNA-Polymerase in der folgenden PCR beeinträchtigen würden.

Zunächst erfolgte die Versetzung der Proben mit 200 µl Phenol (1:1). Danach musste das Gemisch so lange invertiert werden, bis sich eine homogene Phase aus Phenol und

Dottersack-Lösung zeigte. Eine anschließende Zentrifugation für 10 min. mit 13000 Upm (Eppendorf 5415D) trennte die obere, wässrige Phase von der unteren, organischen und der intermediären, proteinhaltigen Phase. Im Folgenden wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde die wässrige Phase mit einem Volumen einer Phenol/Chloroform (1:1)-Mischung versetzt und erneut invertiert, bis sich ein homogenes Gemisch einstellte. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation (13000 Upm, Eppendorf 5415D) und einer anschließenden Abnahme der wässrigen Phase wurde diese in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Der nächste Schritt bestand in einer Versetzung der wässrigen Phase mit 200 µl Chloroform (1:1), dann wurde erneut invertiert und 10 min. lang bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D). Die erhaltene wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen und einer anschließenden Salzfällung unterzogen. Zur Präzipitation der DNA wurden 0,1 Volumen Natriumacetat und 3 Volumen Ethanol (abs.) mit den Proben vermischt; es folgte eine kurze Invertierung und eine 5-minütige Zentrifugation (Eppendorf 5415D), damit ein DNA-Pellet entstand. Im Folgenden wurde soviel Ethanol wie möglich abgenommen, jedoch ohne das DNA-Pellet zu zerstören. Nun erfolgte ein Waschschritt mit 500 µl 70%igem Ethanol, um zurückgebliebene Spuren von SDS, EDTA und Phenol zu entfernen. Weiterhin wurde die Lösung gevortext und 1 min. zentrifugiert (13000 Upm, Eppendorf 5415D), bis ein fast durchsichtiges DNA-Pellet entstand. Der wiederholten Abnahme des Ethanol-Überstandes folgte eine Lufttrocknung bei Raumtemperatur. Schließlich konnte die DNA in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und bis zur Genotypisierungs-PCR bei 4°C kühl aufbewahrt werden.

Verwendete Lösungen:

Dottersack-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 1% SDS
Phenol	
Chloroform	
Phenol/Chloroform	1:1
Natriumacetat	3 M; pH 6
Ethanol	abs.

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in ddH_2O
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
Proteinase K	Roche #03115852001

2.3.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwänzen von Mausembryonen

Bei der Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Dottersäcken von Mausembryonen kann es zur Kontamination des embryonalen Gewebes durch Rückstände der maternalen Umgebung kommen. Um dies zu vermeiden, kann alternativ auch DNA aus den embryonalen Mausschwänzen gewonnen werden. Diese werden von den Embryonen getrennt, mit sterilem PBS gewaschen und danach in ein Eppendorf-Gefäß mit 200 µl Dottersack-Puffer und 10 µl Proteinase K überführt. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 56°C im Wärmebad erfolgt die Phenol-Chloroform-Extraktion wie unter 2.3.2 beschrieben.

Verwendete Lösungen:

Dottersack-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 1% SDS
Phenol	
Chloroform	
Phenol/Chloroform	1:1
Natriumacetat	3 M; pH 6
Ethanol	abs.
70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in ddH_2O
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
Proteinase K	Roche #03115852001

2.3.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Schwanzspitzen adulter Mäuse

Zur Genotypisierung der Mauszuchtpaare sollte die DNA aus adulten Mausschwänzen isoliert werden. Dafür wurden die Gewebeproben mit 450 µl Schwanzspitzen-Puffer sowie 50 µl Proteinase K versetzt und bei 56°C über Nacht verdaut. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Salzfällung durchgeführt (siehe 2.3.2). Die aufgereinigte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und in einer Genotypisierungs-PCR (siehe 2.3.7) eingesetzt.

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in ddH_2O
Chloroform	
Ethanol	abs.
Natriumacetat	3 M; pH 6
Phenol	
Phenol/Chloroform	1:1
Proteinase K	Roche #03115852001
Schwanzspitzen-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM EDTA, pH 8,0 100 mM NaCl 1% SDS
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0

2.3.5 RNA-Isolierung aus Gliedmaßen von Mausembryonen

Die RNA-Isolierung aus embryonalen Gliedmaßen wurde nach den Angaben des Herstellers des RNeasy Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Zunächst wurden die Gliedmaßen von den Embryonen getrennt und in 300 µl RLT-Puffer homogenisiert. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation (13000 Upm, Eppendorf 5415D) wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Folgend wurden 350 µl Ethanol (70%) zugegeben, 700 µl der Suspension in eine Säule pipettiert und für 15 sec.

zentrifugiert (10000 Upm, Eppendorf 5415D). Der Durchfluss wurde verworfen und das verbliebene RNA/DNA-Gemisch einem DNAse-Verdau unterzogen. Dafür wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und für 15 sec. bei 10000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D). Der generierte Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule mit 80 µl einer DNaseI-Lösung (hergestellt nach Angaben der Produktionsfirma) für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte mit 350 µl bzw. 700 µl RW1-Puffer und einer zwischenzeitlichen Zentrifugation für 15 sec. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D). Nach einer weiteren Zentrifugation für 1 min. bei 10000 Upm (Eppendorf 5415D) wurde die Säule zweifach mit 15 µl RNAse freiem Wasser befüllt, für 1 min. bei 10000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D) und der Durchfluss in einem neuen Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Anschließend wurde die isolierte RNA mit Hilfe reverser Transkriptasen in die komplementäre DNA (engl. complementary DNA, cDNA) umgewandelt (siehe 2.3.10) und in eine Real-time-Analyse (siehe 2.3.11) eingesetzt.

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in ddH_2O	
RNase-Free DNase Set (50)		Qiagen #79254
RNeasy Kit		Qiagen #74104

2.3.6 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmen zu können, wurde mit einem Spektralphotometer (Pharmacia; Ultrospec2000) gearbeitet. Die Messung der Konzentration erfolgte in Verdünnungsreihen (1:100; 1:200; 1:500) und bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Bei einer Quarzküvettenschichtdicke von 1 cm und der Messung der Extinktion E_{260} entspricht ein Absorptionswert von 1 (nach Abzug des Referenzwertes der entsprechenden Pufferlösung) einer Konzentration von ungefähr:

E_{260} dsDNA = 50 µg/ml
E_{260} RNA = 25 µg/ml

Um zu klären, wie stark die gewonnenen Nukleinsäuren verunreinigt sind, wurde der Quotient aus den gemessenen Absorptionskoeffizienten E_{260} und E_{280} gebildet. Werte zwischen 1,8 und 2,0 deuten auf eine schwache Verunreinigung der Nukleinsäuren hin.

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) (Saiki *et al.*, 1988) handelt es sich um eine Technik, mit der man jedes beliebige DNA-Molekül durch *in vitro*-Amplifikation sehr schnell vermehren kann. Die DNA wird dabei unter geeigneten Bedingungen mit dem thermostabilen Enzym DNA-Polymerase und spezifischen Oligonukleotiden (auch „Primer" genannt) inkubiert. Die chemisch synthetisierten Primer werden von der DNA-Polymerase zum Start der DNA-Synthese benötigt. Sie sind komplementär zu den beiden 3`-Enden des zu vervielfältigenden DNA-Fragments und dienen als Matrizen für den Ablauf der PCR. Zunächst wird die DNA kurz erhitzt, damit es zur Auftrennung der komplementären Stränge (Templates) kommt. Als zweiter Schritt folgt die Abkühlung, in der die Primer über Wasserstoffbrücken mit ihren Zielsequenzen, den 3`-Enden, hybridisieren können. Hierbei lagert sich explizit jedes Oligonukleotid an ein Strangende. Weiterhin bindet nun die DNA-Polymerase an die Matrize und verlängert die sich dort befindenden Primer durch das Anhängen von Nukleotiden. Folgend wird die DNA wieder erhitzt und das neu entstandene, komplementäre Fragment kann im nächsten Zyklus als Matrize dienen.

2.3.8 Die PCR-Amplifikation

Die PCR-Reaktion wurde in dünnwändigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis angesetzt. Das Gesamtvolumen der Proben belief sich auf 20 µl bzw. 50 µl. Die verwendeten Thermozykler waren die Eppendorf-Mastercycle-Gradient- oder die MWG-(Primus 25)-Maschine. Die verwendeten DNA-Polymerasen waren entweder die „P-*Taq*"-Polymerase, die im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach dem Protokoll von Pluthero hergestellt wurde (Pluthero, 1993), oder die Go*Taq*-Polymerase mit dem entsprechenden Puffersystem (Promega #M830B). Die folgenden Standard-PCR-Ansätze wurden in dieser Arbeit benutzt:

Tabelle 2.1: PCR-Ansätze

	20 µl Ansatz	**50 µl Ansatz**
DNA (Template)	1 µl	3 µl
PCR-Puffer (5x)	4 µl	10 µl
dNTP (je 10 mM)	0,4 µl	1 µl
Primer1 (10 pmol/µl)	1 µl	3 µl
Primer2 (10 pmol/µl)	1 µl	3 µl
***Taq*-Polymerase (5 U/µl)**	0,1 µl	0,25 µl
ddH_2O (autoklav.)	12,5 µl	29,75 µl

Für die Genotypisierung von Embryonen wurden die aufgeführten Primer eingesetzt (siehe Tabelle 2.2). Der Nachweis des *Ftm*-Gens erfolgte durch die Verwendung der KO2f- und KO2r-Primer, während *Ftm*-negative Allele durch die KONEOf- und KO2r-Primer nachgewiesen wurden.

Tabelle 2.2: Genotypisierungsprimer

Bezeichnung	**Sequenz (5' nach 3')**	**Referenz**
KO2f	GGCCTCCCCTTTGTCAT	Jeanette Vierkotten*
KONEOf	ACGAGTTCTTCTGAGGGGATC	Jeanette Vierkotten*
KO2r	CAGCTTTCCTTGTGTCTCTACTT	Jeanette Vierkotten*

* Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Für die Genotypisierungen wurden folgende Reaktionsbedingungen festgelegt:

Tabelle 2.3: PCR-Reaktionsbedingungen

Schritt	**Temperatur [°C]**	**Zeit**	**Zyklenzahl**
1) Denaturierung	95°C	2 min.	1x
2) Denaturierung	94°C	30 sec.	
3) Primer-Hybridisierung	56°C	30 sec.	35x
4) Polymerisation	72°C	45 sec.	
5) Abschließende Polymerisation	72°C	7 min.	1x

Die PCR-Reaktionen konnten anschließend bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei 4°C gelagert werden.

Verwendete Lösungen und Materialien:

5x Green GoTaq® Reaction Buffer	5x	Promega #M7911
dNTP-Gemisch	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP	Thermo Scientific #R0182
Oligonukleotide	100 pmol/µl in ddH_2O	MWG Biotech
ddH_2O	autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	
***Taq*-Polymerase**	5 U/µl	

2.3.9 Verwendete Plasmidvektoren und Oligonukleotide

Für die Klonierung der RID-Domäne in den „Doppeltag"-Vektor wurden folgende Primer und Plasmidvektoren verwendet:

Tabelle 2.4: Klonierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Referenz
For_DT_Stop	TTCCTGCAGGTAACCACTAGAAAGACCAT	diese Arbeit
Rev_DT_Stop	TTCCTGCAGGATCCCAGCGGGTTTCTAGATGCTAGAG	diese Arbeit

Tabelle 2.5: Plasmidvektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Referenz
pcDNA3-Flag/RID	Überexpression der RID-Domäne und anschließende Immunofluoreszenzfärbung	Jeanette Vierkotten*
pcDNA3-Flag/CC1-CC5	Überexpression der CC1-CC5-Domänen und anschließende Immunofluoreszenzfärbung	Sean Lin*
pcDNA3-Flag/C2	Überexpression der C2-Domänen und anschließende Immunofluoreszenzfärbung	Katrin Götz*
pCMV-Myc/Gatad1	Überexpression von Gatad1 und anschließende TAP-Analyse	Jennifer Auchter*
pCMV-Myc/Psmd2	Überexpression von Psmd2 und anschließende TAP-Analyse bzw. Koimmunopräzipitation	Christoph Gerhardt*
Doppeltag (DT)-Vektor	Klonierungsvektor zur Generierung des Flag/Strep/HA-RID-Fusionsproteins	Axel Gödecke**

* Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
** Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2.3.10 Reverse Transkription

Die Synthetisierung von komplementärer DNA (engl. complementary DNA, cDNA) aus RNA wurde anhand der Methode der reversen Transkription (Kogan *et al.*, 1987) mit Hilfe des „Expand Reverse Transcriptase"-Systems von Roche durchgeführt. Es wurden 2 µg Total-Gliedmaßen-RNA und 25 pmol Oligo(dT)-Oligonukleotide (Sequenz: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT T-3') verwendet. Das Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers ausgeführt.

Verwendete Lösungen:

Expand Reverse Transcriptase	Roche #11785826001
Oligo(dT)-Oligonukleotide	MWG #SP230

2.3.11 Real-time-PCR-Untersuchungen

Die Real-time (engl. für Echtzeit)-PCR-Untersuchung basiert auf dem Verfahren einer Standard-PCR (siehe 2.3.7), jedoch mit dem Unterschied, dass die synthetisierte DNA zu jedem Zeitpunkt der exponentiellen Amplifikation quantifiziert werden kann. Die Quantifizierung wird durch die Messung der Fluoreszenz-markierten, neusynthetisierten DNA realisiert. In dieser Arbeit wurden so genannte „TaqMan-Sonden" benutzt, die auf der Methode der FRET (engl. fluorescence resonance energy transfer)-Analyse basieren, um die DNA zu markieren. Dabei wird durch Lichtanregung eines Donor-Fluorochroms („Reporter") Energie freigesetzt und auf ein Akzeptor-Fluorochrom („Quencher") übertragen. Die TaqMan-Sonde besitzt an ihren Enden jeweils ein Reporter- und ein Quencher-Fluorochrom. Durch die strahlungsfreie Energieübertragung wird die Fluoreszenz des Reporters vom Quencher unterdrückt. Nachdem die TaqMan-Sonde an ihre komplementäre DNA gebunden hat, wird durch die Taq-Polymerase nicht nur DNA polymerisiert, sondern es kommt auch zu einem Abbau des Quenchers am Ende der TaqMan-Sonde. Die so hervorgerufene Separierung von Reporter und Quencher führt zu einer steigenden Fluoreszenz des Reporters. Somit kann die Fluoreszenz, die proportional zum PCR-Produkt zunimmt, jederzeit quantitativ gemessen werden. Als Template für die Real-time-Analysen diente cDNA, die aus der RNA von embryonalen Gliedmaßenzellen (E12.5) isoliert und konvertiert wurde (siehe 2.3.10). 50 ng Gliedmaßen-cDNA wurde in einen Ansatz aus TaqMan Universal PCR Master Mix, TaqMan-Assay (Gen-spezifische

Primer und Sonde) und ddH_2O gemischt. Eine Standard-Reaktionsbedingung wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2.6: Standard-Reaktionsbedingung für die Real-time-PCR

	20 µl Ansatz
cDNA	3 µl
ddH_2O (autoklav.)	6 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	10 µl
TaqMan-Assay (Gen-spezifische Primer, Sonde)	1 µl

Folgende TaqMan-Assays wurden verwendet:

Tabelle 2.7: Bestellnummern der verwendeten TaqMan-Assays

Name des Gens	**Hersteller**	**Bestellnummer des TaqMan Assays**
Gapdh	Applied Biosystems	Mm99999915_g1
Gli3	Applied Biosystems	Mm00492345_m1

Die Real-time-PCR wurde im „StepOne Real-time PCR System Thermal Cycling Block" (Applied Biosystems #4376357) durchgeführt und jeder Proben-Ansatz in Triplikaten gemessen. Bei der relativen Quantifizierung wurde mit den so genannten „Ct-Werten" (engl. cycle threshold, für Schwellenwert-Zyklus) gerechnet. Dabei handelt es sich um den Wert, der sich bei der Messung der Fluoreszenz erstmalig signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Die Berechnung wurde mit Hilfe der ΔΔCt-Methode realisiert.

Verwendete Lösungen:

TaqMan Universal PCR Master Mix Applichem #A1091

2.4 Klonierungstechniken

2.4.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die die DNA-Doppelhelix sequenzspezifisch schneiden können und somit ein Werkzeug für die Generierung definierter DNA-Fragmente darstellen. Zur Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von den Firmen NEB oder Roche verwendet und in den mitgelieferten Reaktionspuffern eingesetzt. In einem Standard-Ansatz wurden pro µg DNA 1-10 U Enzym in 1x Reaktionspuffer verwendet. Je nach Enzym variierte die Inkubationszeit zwischen 1 und 15 Stunden bei

37°C. Nach der restriktionsenzymatischen Spaltung der DNA wurden die gewonnenen Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.4.2) und wahlweise aus den Agarosegelen isoliert (siehe 2.4.3).

2.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen

Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese Methode beruht auf der Wanderung negativ-geladener DNA innerhalb eines Agarosegels unter der Wirkung eines elektrischen Feldes. Die Auftrennung der DNA-Moleküle und ihre Laufgeschwindigkeit sind abhängig von der angelegten Spannung, der Molekülmasse und der Konzentration des verwendeten Agarosegels. Kleinere DNA-Moleküle wandern schneller zur Anode (positiv geladener Pol) als größere, trägere DNA-Moleküle. Die DNA-Fragmente wurden abhängig von ihrer Größe, in Agarosegelen mit einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 2% (w/v) aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer diente das TAE-Puffersystem. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurde zur aufgekochten Agaroselösung aus der Mikrowelle 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Der Ethidiumbromid-Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA und ermöglicht so eine Detektion dieser unter UV-Bestrahlung. Die fertige Lösung wurde zunächst in spezielle Gelträger gegossen und dann zum Abkühlen stehen gelassen. Danach wurden die zu analysierenden DNA-Proben noch vor der Beladung des Gels mit 0,2 Volumenanteilen DNA-Auftragspuffer vermischt. Damit eine anschließende Größenabschätzung möglich war, wurde ein Längenstandard ebenfalls mit DNA-Auftragspuffer versetzt und mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben wurde bei Raumtemperatur und einer konstant gehaltenen Spannung von 5 Volt/cm durchgeführt. Weiterhin wurden die DNA-Fragmente unter einer UV-Lampe (254 nm) detektiert und mittels einer PC-gestützten Video-Dokumentationsanlage fotografiert.
Wurden die DNA-Moleküle für eine anschließende Ligation benötigt (siehe 2.4.4), erfolgte die Detektion bei 366 nm mit energieärmerem UV-Licht aus einer Hand-UV-Lampe (Konrad Benda). Somit wurde die durch UV-Licht verursachte Modifikation der DNA minimiert und das Agarose-Fragment konnte aus dem Gel ausgeschnitten werden (siehe 2.4.3).

Verwendete Lösungen:

Agarose	Applichem #A1091

TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 2 mM EDTA pH 8,2	
Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G in TAE	Merck #14277
Ethidiumbromid	10 mg/ml in ddH_2O	Applichem #A1151
1kb-DNA-Leiter	12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp	GibcoBRL #15615-024

2.4.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nachdem ein Agarose-DNA-Fragment aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten wurde, erfolgte eine Extraktion der DNA mittels des „Qiaquick Gel Extraction"-Kits (Qiagen). Dabei wird die DNA unter hohen Salzkonzentrationen an der Oberfläche einer Kieselerdemembran gebunden und aufgereinigt (Vogelstein und Gillespie, 1979). Zunächst wurde das Agarose-DNA-Fragment gewogen, mit dem 3-fachen Volumen QG-Puffer vermischt (100 mg ~100 µl) und bei 50°C für 10 min. auf einem Schüttler (1000 Upm, Eppendorf Thermomixer compact) inkubiert. Danach wurde das Gemisch mit einem Gelvolumen Isopropanol (abs.) versetzt und auf eine Qiaquick-Säule in einem Eppendorf-Gefäß geladen. Es folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 16000 Upm (Eppendorf 5415D). Durch die Bindung der DNA an die Säulenmembran konnte der Durchfluss verworfen werden. 500 µl QG-Puffer wurden erneut auf die Säule geladen und für 1 min. zentrifugiert (Eppendorf 5415D). In einem Waschschritt mit 750 µl PE-Puffer sollte die DNA von den hohen Salzkonzentrationen befreit werden. Die Probe wurde darauf folgend 2-mal bei 16000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5415D). Um die aufgereinigte DNA zu eluieren, wurde die Säule in ein frisches Eppendorf-Gefäß umgesetzt und mit 50 µl EB-Puffer beladen. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit konnte die Probe abermals für 1 min. zentrifugiert werden und die DNA wurde im Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die Qualität und Konzentration der erhaltenen DNA-Probe wurde gelelektrophoretisch (siehe 2.4.2) überprüft.

Verwendete Lösungen:

Isopropanol	abs.	Applichem #A1091
Qiaquick Gel Extraction Kit		Qiagen #28704

2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten („Insert“) in einen Plasmidvektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Im Standard-Reaktionsgemisch von 30 µl wurde das Verhältnis von Plasmidvektor zu Insert variiert (1:3, 1:5 oder 1:10) und alles für 15 Stunden bei 14°C inkubiert. Im Anschluss konnte die ligierte DNA direkt in eine Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt werden (siehe 2.4.6.2).

Tabelle 2.8: Standard-Reaktionsbedingung für eine Ligation

	30µl Ansatz	**Hersteller**
10x Ligasepuffer	3 µl	GibcoBRL
T4-Ligase (5U/µl)	2 µl	GibcoBRL
Plasmidvektor	1 µl	
Insert	5 µl	
ddH_2O (autoklav.)	19 µl	

2.4.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-DNA-Produkten (siehe 2.3.7) wurde am Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

2.4.6 Transformation von Plasmiden in Bakterien

2.4.6.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien gehören dem *Escherichia coli*-Stamm JM109 (recA1, lacZΔM15) an. Kompetente Bakterien wurden nach dem Protokoll von Inoue *et al.* generiert (Inoue *et al.*, 1990). Zunächst wurde eine Übernachtkultur von 20 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C auf einem Plattformschüttler (120 Upm, Heidolph Polymax 1040) bewegt. Diese diente am nächsten Tag zur Animpfung einer 250 ml-Hauptkultur in SOB-Medium bei Raumtemperatur. Die Bakteriendichte in der Hauptkultur wird über die Messung der optischen Dichte bei 600

nm (OD_{600}) bestimmt. Ist eine OD_{600} von 0,9 erreicht wurde die Bakterienkultur für 10 min. auf Eis abgekühlt. Nach einer Zentrifugation von 10 min. bei 4°C (2500 Upm, Heraeus, Megafuge 1.0R) wurde das erhaltene Bakterienpellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Die letzten beiden Schritte wurden wiederholt, wobei das Bakterienpellet diesmal in 20 ml eiskaltem TB-Puffer mit Zugabe von DMSO zu einer Endkonzentration von 7% (v/v) resuspendiert wurde. Schließlich wurden die Bakterien für 10 min. auf Eis inkubiert und darauf folgend als 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien konnten dann bei -80°C gelagert werden.

Verwendete Lösungen:

LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
	1% (w/v) Trypton	Applichem #A1553
	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	Applichem #A1552
	in ddH_2O	
	autoklav., 121°C, 2 bar, 30 min.	
SOB-Medium	2% (w/v) Trypton	Applichem #A1553
	0,5% Hefe-Extrakt	Applichem #A1552
	10 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	10 mM $MgCl_2$	
	10 mM $MgSO_4$	
	pH 6,7-7	
TB-Puffer	10 mM PIPES	
	55 mM $MnCl_2$	
	15 mM $CaCl_2$	
	250 mM KCl	
	pH 6,7	

2.4.6.2 Transformation

Die bei -80°C gefrorenen 200 µl-Aliquots kompetenter Bakterienkulturen (siehe 2.4.6.1) wurden für eine Transformation langsam auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA (20 bis 100 ng) bei 4°C für 13 min. inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock für 45 sec. bei 42°C und anschließend ein erneuter Inkubationsschritt für 3 min. auf Eis. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde die Bakteriensuspension für 30 bis 45 min. bei 37°C leicht geschüttelt (1000 Upm, Eppendorf Thermomixer compact). Der Zentrifugation bei 6000 Upm (3min., Eppendorf 5415D) schloss sich die Abnahme des Überstands (bis auf 100 µl

Restflüssigkeit) an. Die pelletierten Bakterien wurden im Restüberstand resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Nach der Übernachtinkubation bei 37°C konnte die transformierte Einzelkolonie zur Animpfung von Bakterienkulturen genutzt werden (siehe 2.3.1.1 und 2.3.1.2).

Verwendete Lösungen:

LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in ddH_2O autoklav.; 121°C, 2 bar, 30 min.	 Applichem #A1553 Applichem #A1552
Selektionsplatten	1,5% (w/v) Bacto-Agar 50 µg/µl Ampicillin in LB-Medium	Applichem #A0949 Applichem #A0839

2.5 Immunofluoreszenzanalysen

2.5.1 Anfertigung von Gefrierdünnschnitten

2.5.1.1 Präparation, Fixierung und Einbettung von Embryonen

Nach der Isolation (siehe 2.1.2) wurden die Embryonen für 90 min. bei 4°C in 4% PFA fixiert. Es folgten ein Waschschritt der Präparate mit PBS und eine Entwässerung in einer 30% Saccharose/PBS-Lösung. In dieser Lösung wurden die Embryonen leicht schüttelnd bei 4°C über Nacht auf einer Wippe inkubiert, bis sie zum Boden der Lösung absanken. Am nächsten Tag folgte die Einbettung in O.C.T.-Einbettmedium und das Einfrieren auf Trockeneis. Die Präparate wurden bis zur Schnittanfertigung bei -80°C gelagert.

2.5.1.2 Anfertigung von Gefrierdünnschnitten

Die in O.C.T.-Blöcken eingebetteten Embryonen wurden zunächst im Kryostat für 10 min. bei -30°C vorinkubiert. Es folgte die Schnittanfertigung mit einer Schnittdicke von 7 µm. Die Schnitte wurden auf Objektträgern aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Verwendete Lösungen und Materialien:

Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) in PBS	Merck #104004

Saccharose	30% (w/v) in PBS	Merck #107651
O.C.T.-Einbettmedium		Tissue-Tec O.C.T. Compound, Miles Laboratories Inc. #4583
Kryostat	CM 3050S	Leica
PBS	4 mM $NaH_2PO_4*H_2O$ 16 mM $Na_2HPO_4*2H_2O$ 150 mM NaCl gelöst in ddH_2O pH 7,3; autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.	
Objektträger	SuperFrost Plus	Menzel #J1800AMNZ

2.5.2 Immunofluoreszenzfärbungen

Bei Antikörpern handelt es sich um vom Immunsystem hergestellte Proteine, die in der Lage sind, mit ihrer spezifischen Bindungsstelle andere Fremd-Antigene zu binden. Diese Fähigkeit wird in der Forschung genutzt, um intrazelluläre Proteine mit Hilfe von spezifischen Erstantikörpern zu detektieren. Die Erstantikörper ihrerseits können von spezies-spezifischen Zweitantikörpern, welche an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, erkannt werden. Der Einsatz eines Fluoreszenzmikroskops ermöglicht anschließend die Detektion des Antikörper-Komplexes durch Anregung mit unterschiedlichen Licht-Wellenlängen. In dieser Arbeit wurden intrazelluläre Proteine durch den Einsatz mehrerer spezifischer Erstantikörper auf fixierten Zellkulturen und Gefrierdünnschnitten nachgewiesen.

2.5.2.1 Immunofluoreszenzfärbung auf Gefrierdünnschnitten

In dieser Arbeit wurde die Methode der Immunofluoreszenzfärbung auf Gefrierdünnschnitten angewendet, um Antigene auf spezifischen Proteinen innerhalb von embryonalen Geweben nachzuweisen und ihre intrazelluläre Lokalisierung zu bestimmen. Die Immunofluoreszenzfärbung der Gefrierdünnschnitte wurde direkt auf Objektträgern (siehe 2.5.1.2) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift. Danach wurde das O.C.T. auf den Schnitten durch drei Waschschritte für je 15 min. mit PBS bei Raumtemperatur entfernt. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit 10% FCS/PBS-T, um das unspezifische Binden von Erstantikörpern abzublocken. Weiterhin

wurde der entsprechende Erstantikörper (siehe Tabelle 2.9) in einer 10%igen FCS/PBS-T-Lösung verdünnt, auf die Objektträger pipettiert und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Erstantikörper-Lösung abgeschüttet und erneut dreimalig für 15 min. mit PBS gewaschen. Nun wurde der Zweitantikörper (siehe Tabelle 2.10) in einer 10%igen FCS/PBS-T-Lösung verdünnt, auf die Schnitte aufgetragen und für 2 bis 2,5 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten und dunklen Kammer inkubiert. Darauf folgten drei 15-minütige Waschschritte im Dunkeln mit PBS-T und die Schnitte konnten mit Mowiol (wahlweise DAPI-haltig, zur Detektion der Zellkerne) eingedeckelt werden. Die eingedeckelten Gefrierdünnschnitte wurden vor dem Mikroskopieren bei -80°C im Dunkeln gelagert.

Verwendete Lösungen und Materialien:

DAPI-Lösung	DAPI-Reagenz in PBS (0,1 µg/ml)	Merck #1246530100
Fettstift	ImmEdge Pen	Vektor Laboratories Inc. #H-4000
Mowiol	5 g Mowiol in 20 ml PBS gelöst 10 ml Glycerin 15 min. bei 12000 Upm zentrifugieren	Polysciences #17951
Objektträger	SuperFrost Plus	Menzel #J1800AMNZ
PBS	4 mM $NaH_2PO_4*H_2O$ 16 mM $Na_2HPO_4*2H_2O$ 150 mM NaCl gelöst in ddH_2O pH 7,3; autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.	
PBS-T	PBS 0,5% (v/v) Triton-X-100	Sigma #234729
Deckgläschen	24x60 mm	Menzel #BB024060A1

2.5.2.2 Immunofluoreszenzfärbung von Zellen

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen (siehe 2.2.5) wurden zunächst dreimalig mit PBS gewaschen. Anschließend folgten je nach später verwendetem Erstantikörper (Tabelle 2.9) unterschiedliche Fixierungen der Zellen. Optional wurde entweder:

→ für 1 Stunde mit 4% PFA bei 4°C

→ für 5 min. Methanol (abs.) bei -20°C

→ für 5 min. mit 4% PFA bei 20-25°C und 3 min. Methanol (abs.) bei -20°C

→ für 5 min. Methanol (abs.) und 3 min. Aceton bei jeweils 4°C

fixiert. Nun wurden die Zellen erneut 3-fach mit PBS gewaschen und für 10 min. mit 0,5% PBS-T inkubiert, um eine Permeabilisierung der Zellmembran zu erzielen. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschritt mit PBS-T erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen in 10% FCS/PBS-T für 10 min.. Im Anschluss wurde der entsprechende Erstantikörper (siehe Tabelle 2.9) aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am Folgetag konnte die Erstantikörperlösung wieder entfernt werden und die Zellen wurden 3-fach für je 1 min. mit 0,1% PBS-T gewaschen. Weiterhin wurde der Zweitantikörper (siehe Tabelle 2.10) in 10% FCS/PBS-T verdünnt und bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer inkubiert. Nach 1 Stunde konnte die Zweitantikörper-Lösung entfernt werden und es wurde erneut 3-fach für 1 min. mit 0,1% PBS-T gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss mit Mowiol (wahlweise DAPI-haltig) auf Objektträgern eingedeckelt und über Nacht zur Trocknung bei 4°C gelagert. Die spätere Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bei -20°C. Es wurden folgende Erst- und Zweitantikörper verwendet:

Tabelle 2.9: Erstantikörper

Name des Antikörpers	Fixierung	Bezugsquelle	Verdünnung
Arl13b	PFA	Proteintech #17711-1-AP	1:200
acetyliertes-α-Tubulin	PFA	Sigma-Aldrich #T6793	1:1000
B9D1	MeOH	Novus Biologicals #H00027077-B01P	1:200
BBS5	PFA/MeOH	Proteintech #14569-1-AP	1:200
CSPP1	MeOH	Proteintech #11931-1-AP	1:200
Flag	PFA	Stratagene #200472	1:200
Ftm	PFA	Jeanette Vierkotten*	1:200
Gli3-190	PFA	Kerstin Rose*	1:1000
Gli3	PFA	R&D systems #AF3690	1:50
IFT88	PFA	Proteintech #13967-1-AP	1:200
INVS	MeOH	Proteintech #10585-1-AP	1:200
MKS1	MeOH	Proteintech #16206-1-AP	1:200
Nphp1	MeOH	Santa Cruz Biotechnology #sc-20204	1:50
Nphp4	PFA	Ronald Roepman**	1:200
Nphp6	PFA	Sophie Saunier***	1:100
Psma5	PFA/MeOH	Pierce Biotechnology #PA1-1962	1:200
Psmd2	MeOH	Imgenex #IMG-3751	1:200

Psmd3	MeOH/Ace	Sigma-Aldrich #S2824	1:200
phospho-(S33/37/T41)-β-Catenin	PFA	Cell Signaling #9561	1:200
Rpgr	PFA	Li Tiansen****	1:1000
Rpgrip1	MeOH	Proteintech #13214-1-AP	1:100
SEPT2	MeOH	Proteintech #11397-1-AP	1:200
Sstr3	MeOH	Pierce Biotechnology #PA3-207	1:100
Sufu	MeOH	Santa Cruz Biotechnology #sc-28847	1:100
TCTN1	MeOH	Proteintech #15004-1-AP	1:200
TCTN2	MeOH	Proteintech #17053-1-AP	1:200
TCTN3	MeOH	Proteintech #16085-1-AP	1:200
Tmem67	MeOH	Proteintech #13975-1-AP	1:100
γ-Tubulin	PFA	Sigma-Aldrich #T6557	1:200
γ-Tubulin	PFA	Santa Cruz Biotechnology #sc-7396	1:50
Ubiquitin	MeOH/Ace	Sigma-Aldrich #U5379	1:200

* Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
** Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Niederlande
*** Universität Paris-Descartes, Frankreich
**** Harvard Medical School, Boston

Tabelle 2.10: Zweitantikörper

Name	Bezugsquelle	Verdünnung
Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	Dianova #711-485-152	1:200
Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy3	Dianova #711-165-152	1:200
Esel anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	Dianova #715-485-151	1:200
Esel anti-Maus IgG (H+L)-Cy3	Dianova #715-165-151	1:200
Esel anti-Maus IgG (H+L)-DyLight 405	Rockland #610-746-002	1:50
Esel anti-Meerschweinchen IgG (H+L)-Cy3	Dianova #706-165-148	1:200
Esel anti-Ziege IgG (H+L)-Cy3	Dianova #705-165-147	1:200
Esel anti-Ziege IgG (H+L)-DyLight 405	Dianova #705-475-003	1:50

Verwendete Lösungen:

Mowiol	5 g Mowiol in 20 ml PBS gelöst 10 ml Glycerin 15 min. bei 12000 Upm zentrifugieren	Polysciences #17951
DAPI-Lösung	DAPI-Reagenz in PBS (0,1 µg/ml)	Merck #1246530100
PBS	4 mM $NaH_2PO_4*H_2O$ 16 mM $Na_2HPO_4*2H_2O$ 150 mM NaCl gelöst in ddH_2O pH 7,3; autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.	
Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) in PBS	Merck #104004

PBS-T	PBS 0,5% (v/v) Triton-X-100	Sigma #234729
fötales Kälberserum (FCS)		PAA Laboratories #A15-080

2.6 Proteinbiochemie

2.6.1 Aufreinigung von Proteinkomplexen

2.6.1.1 Vorbereitungen der Zellen

Zunächst wurden NIH3T3- oder HEK293T-Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät und nach den Angaben des Herstellers des PolyFect-Transfektionsreagenz (siehe 2.2.7) mit den entsprechenden Plasmidvektoren (siehe 2.3.9) transfiziert. Gleichzeitig wurden auch Kontroll-Zellen ausgesät, die entweder mit Kontroll-Plasmid-DNA (Gatad1) oder ohne Plasmid-DNA transfiziert wurden. Nach einer 24 Stunden-Inkubation konnten die Zellen in einer Koimmunopräzipitation (siehe 2.6.1.2) oder TAP-Aufreinigungsanalyse (siehe 2.6.1.3) eingesetzt werden.

2.6.1.2 Koimmunopräzipitation

Eine Methode, um potentielle Interaktionen zwischen Proteinen zu verifizieren, ist die Koimmunopräzipitation. Dabei wird mit Hilfe eines Antikörpers (der an Agarose-Kugeln gebundenen ist) ein spezifisches Zielprotein aus einem Zell- oder Gewebelysat präzipitiert („Immunopräzipitation“). Gleichzeitig werden auch die Interaktionspartner, die an dem präzipitierten Zielprotein binden, kopräzipitiert („Koimmunopräzipitation“).

Alle Schritte der Koimmunopräzipitation erfolgten bei 4°C. Die vorbereiteten, transfizierten Zellen (siehe 2.6.1.1) wurden mit PBS gewaschen und mit 800 µl Lysispuffer versetzt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis und danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß transferiert und wahlweise 10-mal durch eine Kanüle gezogen. In einem Zentrifugationsschritt (4°C; 15 min.; 13000 Upm, Eppendorf 5415D) sollten die übrigen Zelltrümmer pelletiert werden. Die überstehende Proteinsuspension wurde erneut in ein frisches Eppendorf-Gefäß transferiert. Für jeden Ansatz wurden 60 µl G-Agarose-Kugeln (50%iges Gemisch aus G-Agarose-Kugeln und Lysis-Puffer) benötigt. Zur Vorbereitung der G-Agarose-Kugeln wurden diese 2-fach mit 1 ml kaltem PBS und einmal mit 1 ml Lysis-Puffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschritt erfolgte eine Zentrifugation für 10

min. bei 4°C und 7000 Upm (Eppendorf 5415D). Es sollte darauf geachtet werden, dass nach jedem Zentrifugieren auch genau 1 ml Flüssigkeit wieder abgenommen wird, da nur so das 50%ige Gemisch aus G-Agarose-Kugeln und Flüssigkeit bestehen bleibt. Pro Ansatz wurden in einem Vorwaschschritt (engl. „Preclearing“) 20 µl G-Agarose-Kugeln mit der zuvor gewonnenen Proteinsuspension vermischt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad rotiert. Weitere 20 µl G-Agarose-Kugeln wurden mit 10 µl des gewünschten Antikörpers (hier Flag- bzw. Myc-Antikörper) versetzt. Die restlichen 20 µl G-Agarose-Kugeln wurden als Kontrolle ohne Antikörper weiter benutzt. Die beiden letztgenannten G-Agarose-Kugel-Gemische wurden mit 800 µl Lysispuffer gestreckt und bei 4°C über Nacht auf einem Drehrad rotiert. Am Folgetag wurde die Proteinsuspension von den Preclearing-G-Agarose-Kugeln durch eine 7-minütige Zentrifugation bei 4°C, 4000 Upm (Eppendorf 5415D) befreit und der Überstand auf drei Eppendorf-Gefäße verteilt: zwei Eppendorf-Gefäße mit jeweils 500 µl und eins mit 100 µl. Die 100 µl-Proteinsuspension galt als „Input“-Probe (engl. für Einsatz) und konnte bis zur SDS-Page (siehe 2.6.3) bei -20°C eingefroren werden, die 500 µl-Proteinsuspensionen wurden weiterverarbeitet. Gleichzeitig wurden die G-Agarose-Kugel-Gemische, die am Tag zuvor jeweils mit und ohne Antikörper inkubiert wurden, für 5 min. bei 4°C abzentrifugiert (3000 Upm, Eppendorf 5415D) und die 800 µl Lysispuffer wieder abgenommen. Es folgte ein Waschschritt der G-Agarose-Kugeln mit 1 ml Lysispuffer für 5 min. bei 4°C (3000 Upm, Eppendorf 5415D). Jede 500 µl-Proteinsuspension konnte nun mit den 20 µl G-Agarose-Kugeln (mit und ohne Antikörper) versetzt werden und die Gemische wurden erneut über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad rotiert. Am nächsten Morgen wurden die 500 µl-Proteinsuspensionen mit den 20 µl G-Agarose-Kugeln (mit und ohne Antikörper) abzentrifugiert (10 min.; 4°C; 3000 Upm, Eppendorf 5415D) und abermals mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Der Überstand konnte nun verworfen werden, da die sich in der Suspension befindenden Proteine spezifisch an die Antikörper auf der Oberfläche der G-Agarose gebunden haben sollten. Jede Probe (auch die „Input“-Probe) wurde nun mit 20 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min. aufgekocht (Eppendorf Thermomixer compact). Die erhaltenen Proben konnten entweder bei -20°C eingefroren oder direkt auf eine SDS-PAGE (siehe 2.6.3) aufgetragen werden. Eine sich anschließende Western Blot-Analyse ermöglicht die Detektion der überexprimierten Proteine mitsamt ihrer Interaktionspartner.

Verwendete Lösungen und Materialien:

Lysispuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4	
	1% NP-40	
	0,25% Na-Deoxycholat	
	150mM NaCl	
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail	Roche #11836153001
	PMSF (10 µl auf 1 ml)	Sigma-Aldrich # 93482
Protein G-Agarose, Fast Flow		Millipore #16-266
4x SDS-Probenpuffer	400 mM Tris-HCl, pH 8,8	
	8% β-Mercaptoethanol	
	40% Glycerin	
	12% SDS	
	0,4% Bromphenolblau	

2.6.1.3 Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP)

Um mögliche Interaktionspartner der CC- und RID-Domänen von Ftm ausfindig zu machen, wurde eine Tandem-Affinitätsaufreinigung (engl. tandem affinity purification, TAP) in Verbindung mit einer Massenspektrometrie durchgeführt. Dabei wird ein Zielprotein mit verschiedenen Tags fusioniert (hier FLAG/Strep/HA-Tag) und über diese mitsamt den gebundenen Interaktionspartnern in einer Zweifach-Aufreinigung isoliert. Weiterhin kann diese Methode auch die Interaktion von bekannten Proteinpartnern verifizieren.

Für eine TAP-Analyse wurden pro Ansatz Zellen aus zehn 10 cm-Zellkulturplatten benötigt. Alle Schritte erfolgten bei 4°C. Die vorbereiteten Zellen (siehe 2.6.1.1) wurden mit PBS gewaschen und pro 10 cm-Zellkulturplatten mit 1 ml Lysispuffer versetzt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis und danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gekratzt. Die Zellsuspensionen wurde in einem 50 ml-Reaktionsgefäß gesammelt und wahlweise 10-mal durch eine Kanüle gezogen. In einem Zentrifugationsschritt (4°C; 15 min.; 6000 Upm, Heraeus Megafuge 1.0) sollten die übrigen Zelltrümmer pelletiert werden. Das überstehende Proteinlysat wurde erneut in ein frisches 50 ml-Reaktionsgefäß transferiert und 50 µl „Input"-Probe zur späteren Kontrolle abgenommen. Nach der Zugabe von 200 µl M2-Agarose-Flag-Kugeln zu dem Proteinlysat konnte das Gemisch für 1 bis 2 Stunden auf einem Schüttler (350 Upm, Eppendorf Thermomixer compact) bei 4°C inkubieren. Für die erste Aufreinigung des Zielproteins wurde eine Mikro Bio-Spin Chromatographie-Säule (BIO RAD) mit 1 ml Lysispuffer äquilibriert und das zuvor gewonnene Proteinlysat mitsamt der M2-Agarose-Flag-Kugeln

auf die Säule pipettiert. Der erzeugte Durchfluss konnte (wie alle später erhaltenen Durchflüsse) aufbewahrt und so die Effizienz des Versuchs in einer SDS-PAGE (siehe 2.6.3) kontrolliert werden. Die Proteine, die an der M2-Agarose (in der Säule) gebunden hatten, wurden im nächsten Schritt 2-fach mit 1 ml TBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Flag-Peptid (jeweils 4x 250 µl-Schritte) von der M2-Agarose in ein 15 ml-Reaktionsgefäß eluiert. Für die zweite Aufreinigung wurde eine neue Mikro Bio-Spin Chromatographie-Säule mit 1 ml Strep-Puffer äquilibriert und dann mit 200 µl Sepharose-Streptactin-Kugeln (IBA Technologies) befüllt. Das Eluat aus der ersten Aufreinigung wurde in 250 µl-Schritten auf die Säule pipettiert. Die sich im Eluat befindenen Proteine konnten nun an die Sepharose-Streptactin-Kugeln binden. Im Folgenden wurden die Proteine 2-fach mit Strep-Puffer gewaschen und mit 1 ml Biotin (jeweils 4x 250 µl-Schritte) von den Sepharose-Streptactin-Kugeln eluiert. Das Eluat wurde in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß aufgefangen und mit 5 µl Strat-Clean-Kugeln versetzt. Diese sind in der Lage sehr effizient Proteine aus einer Lösung aufzukonzentrieren. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad rotiert und die Strat-Clean-Kugeln am Folgetag zentrifugiert (5 min.; 4°C; 3000 Upm, Eppendorf 5415D). Abschließend wurden die Strat-Clean-Kugeln für 10 min. bei 95°C (Eppendorf Thermomixer compact) in 20 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgekocht und auf eine SDS-Page aufgetragen (siehe 2.6.3).

Verwendete Lösungen und Materialien:

TBS	150 mM NaCl 3 mM KCl 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 pH 7,4 mit ddH_2O	
Flag-Peptid	300 µg/ml in TBS	BMFZ*
M2-Agarose-Flag Beads		Sigma-Aldrich #A2220-5ML
Micro Bio-Spin Chromatography Column		BIO RAD #732-6204
Strep-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8 mit ddH_2O	

*Biologisch-Medizinisches-Forschungszentrum (BMFZ), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Sepharose-Streptactin-Beads		IBA Technologies #2-1201-010
Biotin		Sigma #B4501-100MG
Strat Clean Beads		Stratagene #400714
4x SDS-Probenpuffer	400 mM Tris-HCl, pH 8,8 8% β-Mercaptoethanol 40% Glycerin 12% SDS 0,4% Bromphenolblau	

2.6.2 Western Blot-Analysen

Ein Western Blot bezeichnet den elektrophoretischen Transfer von aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran mit einer sich anschließenden Immunodetektion.

2.6.2.1 Proteinextraktion aus Gliedmaßen

Alle Schritte erfolgten entweder bei 4°C oder auf Eis. Die frisch präparierten Gliedmaßen wurden kurz in kaltem PBS gewaschen und danach in den Lysispuffer überführt. Die mechanische Zerkleinerung erfolgte mittels eines Sonifizierungsstabs (PCV Kinematica Status Homogenizator, Littau-Luzern; Bronson sonifier 450, Danburg, CT, USA #102C). Anschließend konnte das gewonnene Proteinlysat entweder direkt verwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

Verwendete Lösungen:

Lysispuffer	50mM HEPES pH 7,3	
	150mM KCl	
	4mM $MgCl_2$	
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail	Roche #11836153001
PBS	4 mM $NaH_2PO_4*H_2O$	
	16 mM $Na_2HPO_4*2H_2O$	
	150 mM NaCl	
	gelöst in ddH_2O	
	pH 7,3; autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.	

2.6.2.2 Proteinextraktion aus Zellen

Alle Schritte erfolgten entweder bei 4°C oder auf Eis. Zunächst wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt und diese kurz in PBS gewaschen. Auf eine 10 cm-Zellkulturschale wurden 100 µl Lysispuffer pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale gekratzt und die Suspension in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die mechanische Zerkleinerung erfolgte mittels eines Sonifizierungsstabs (PCV Kinematica Status Homogenizator, Littau-Luzern; Bronson sonifier 450, Danburg, CT, USA #102C) und einer anschließenden Inkubation für 10 min. auf Eis. Das gewonnene Proteinlysat konnte entweder direkt verwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

2.6.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte eine Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht. Zur Auftrennung von Proteinen mit einem kleinen Molekulargewicht wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel hergestellt, um größere Proteine optimal aufzutrennen wurde ein 7,5%iges Polyacrylamidgel benutzt. Die Proteinlysate wurden mit einer entsprechenden Menge 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min. bei 95°C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend folgte eine 2-minütige Zentrifugation (13000 Upm, Eppendorf 5415D), um eine Sedimentierung der unlöslichen Zelltrümmer zu erreichen. Zunächst wurden die Proben in ein weitporiges Sammelgel aufgetragen, in welchem die Proteinaufkonzentrierung stattfand. Der Übergang der Proteine in das Trenngel führte zur Auftrennung dieser nach ihrem Molekulargewicht und wurde bei einer konstanten Spannung von 200 Volt für 1 bis 2 Stunden durchgeführt. Als Größenreferenz diente der Proteinstandard von Sigma. Die Proteingele wurden anschließend geblottet.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung für jeweils 2 Polyacrylamidgele

	Trenngel 10%	**Trenngel 7,5%**	**Sammelgel 5%**
ddH_2O	1,9 ml	2,8 ml	3,5 ml
1M Tris-HCl pH 8,8	5,6 ml	5,6 ml	-
1M Tris-HCl pH 6,8	-	-	0,6 ml
20% SDS	60 µl	60 µl	25 µl
Acrylamid	3,8 ml	2,8 ml	0,8 ml
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	5 µl
10% APS	60 µl	60 µl	25 µl

Verwendete Lösungen:

1M Tris-HCl pH 8,8	Tris-HCl (1M) in ddH_2O	
1M Tris-HCl pH 6,8	Tris-HCl (1M) in ddH_2O	
20% SDS	20% SDS in ddH_2O	
Acrylamidlösung		Applichem #A0856
TEMED		Merck #1107320100
10% APS	10% Ammoniumpersulfat in ddH_2O	
High Molecular Weight Standard Mixture		Sigma #SDS6H2

2.6.4 Silbergelfärbung von Polyacrylamidgelen

Bei der Silbergelfärbung macht man sich die Reaktion von Silber-Ionen mit Proteinen unter schwach sauren Bedingungen zunutzte. Somit lassen sich kleinste Proteinmengen in Polyacrylamidgelen (siehe 2.4.2) visualisieren.

Während der Silberfärbung wurden alle Inkubationsschritte unter leichtem Schwenken (Plattformschüttler, Heidolph Polymax 1040) des Polyacrylamidgels in einer Färbeschale durchgeführt. Zunächst wurde das Sammelgel (siehe 2.6.3) des Polyacrylamidgels entfernt. Es folgte ein Waschschritt des Trenngels für 1 Stunde mit ddH_2O und eine Inkubation für 20 min. mit Fixierer I. Daraufhin wurde der Fixierer I durch Fixierer II für 2-mal jeweils 10 min. ersetzt. Weiterhin wurde das Polyacrylamidgel erneut für 10 min. mit ddH_2O gewaschen und für 1 min. mit dem Thiosulfatreagenz inkubiert. Als nächstes wurde das Polyacrylamidgel für 20 sec. (3-mal) mit ddH_2O gewaschen und für 20 min. mit der frisch angesetzten Silbernitrat-Färbung inkubiert. Erneut erfolgte ein Waschschritt des Polyacrylamidgels für 20 sec. (3-mal) mit ddH_2O und eine Inkubation mit der Entwickler-Lösung, welche die sich im Polyacrylamidgel befindlichen Proteine sichtbar machte. Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion mit ddH_2O für 20 sec. (3-mal) und der Stop-Reagenzlösung (5 min.) beendet. Nun konnte das Gel fotodokumentiert und in einer 1%igen-Essigsäurelösung gelagert werden. Weiterhin

erfolgte eine massenspektrometrische Bestimmung der gefärbten Proteinbanden durch Michael Reinartz aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Verwendete Lösungen:

Fixierer I	50 ml Essigsäure (100%) 500 ml Methanol (abs.) ddH_2O ad 1000 ml
Fixierer II	500 ml Methanol (abs.) ddH_2O ad 1000 ml
Thiosulfat-Reagenz	200 mg $Na_2S_2O_3$ ddH_2O ad 1000 ml
Silbernitrat	2 g Silbernitrat 500 µl Formaldehyd (37%)

2.6.5 Proteintransfer („Blotten“)

Durch die Technik des Western Blots wird die Übertragung der Proteine aus der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran durch ein elektrisches Feld ermöglicht. Zunächst mussten PVDF-Membranen in Methanol aktiviert und Whatman-Papiere in verschiedene Pufferlösungen eingelegt werden (jeweils 3 Lagen Whatman-Papiere in den Anodenpuffer I, in den Anodenpuffer II und in den Kathodenpuffer). Des Weiteren erfolgte die Auflegung des SDS-Gels auf die Membran und beide Schichten wurden zwischen die Whatman-Papiere in die Blotapparatur gelegt (6 Lagen aus dem Anodenpuffer unten und 3 Lagen aus dem Kathodenpuffer oben). Die Anordnung der verschiedenen Whatman-Papiere ist wichtig, weil sie die Leitung des Stroms und somit den Transfer der Proteine ermöglicht. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran vorhanden waren, da sonst der Protein-Transfer nicht stattfinden kann. Die Blotapparatur wurde zusätzlich beschwert. Geblottet wurde insgesamt 1 Stunde bei 120 mA (BIO-RAD Power Supply). Ob der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgreich war, konnte mit Hilfe einer Ponceau-S-Färbung, welche Proteine unspezifisch und reversibel anfärbt, kontrolliert werden.

Verwendete Lösungen und Materialien:

Anodenpuffer I	0,3 M Tris-Base 20% Methanol, pH 10,4

Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base, 20% Methanol, pH 10,4	
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 20% Methanol, pH 9,4 40 mM Aminokapronsäure	
Ponceau-S-Lösung	0,2% (w/v) Ponceau-S 3% TCA (w/v) in ddH_2O	Applichem #A1405
Whatman-Papier		VWR #732-0591

2.6.6 Immunonachweis von Proteinen

Nach der Ponceau-S-Färbung wurde die Membran kurz in PBT gewaschen und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blocklösung geblockt, um die unspezifischen Bindungen des Erstantikörpers zu minimieren. Danach wurde der Erstantikörper (verdünnt in Blocklösung) auf die Membran überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Entfernen der Erstantikörper-Lösung wurde die Membran 3-mal mit PBT für 15 min. gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Weiterhin wurde nun der Peroxydase gekoppelte Zweitantikörper verdünnt in Blocklösung auf die Membran transferiert und für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschen mit PBT wurde die Membran für 5 min. mit ECL („Enhanced Chemiluminiscence detection reagens“, Amersham, #RPN 2132)-Reagenz bedeckt. Die Detektion von Proteinen erfolgte mittels des ECL-Detektionssystems. Durch die Verwendung des Peroxydase-gekoppelten Zweitantikörpers in Verbindung mit dem ECL-Reagenz findet eine Oxidation von Luminol statt. Dieses geht dann kurzzeitig in einen angeregten Zustand über und gibt beim Übergang in den Grundzustand die erhaltene Energie in Form von Licht wieder ab. Die Reaktion wird als „Chemilumineszenz“ bezeichnet. Die Visualisierung dieser Chemilumineszenz wurde durch einen Luminescent Image Analyzer (LAS-4000 mini; Fujifilm #8692184) übernommen.

Tabelle 2.12: Verwendete Antikörper

Name des Antikörpers	Verdünnung	Bezugsquelle
Gli3	1:50	R&D systems #AF3690
Sufu	1:100	Santa Cruz Biotechnology #sc-28847
Aktin	1:4000	Sigma Aldrich #A2066
Myc	1:200	Santa Cruz Biotechnology #sc-789

HA	1:200	Covance #MMS101P
Flag	1:200	Stratagene #200472
anti-Kaninchen-HRP	1:2000	Dako Cytomation #P0448
anti-Maus-HRP	1:2000	Dako Cytomation #P0260
anti-Ziege-HRP	1:5000	Santa Cruz Biotechnology #sc-2768

Verwendete Lösungen:

PBT	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
Blocklösung	PBT 5% Milchpulver

2.6.7 Quantifizierung der Proteindaten

Die Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten wurde mit Hilfe der Software „Multi Gauge Version 3.2“ von Fujifilm und ImageJ durchgeführt.

2.7 Fotodokumentation und Bildbearbeitung

Die Dokumentation der Immunofluoreszenzfärbungen wurde an einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.A2, Zeiss) mit einem hochauflösenden Objektiv (α-Plan-Apochromat, 100x/1,46 Öl DIC) durchgeführt. Bei der Kamera handelte es sich um die Axiocam MRm Top (Zeiss), bei der Fotosoftware um das AxioVision-Programm (Software Release 4.8.2, Zeiss). Die Superhochauflösungs-Mikroskopie erfolgte mittels der 3D-SIM (engl. structured illumination microscopy)-Technologie an dem ELYRA-System von der Carl Zeiss AG oder am N-SIM-System von der Nikon GmbH.
Eine Nachbearbeitung aller Fotografien sowie die Überlagerung einzelner Farbkanäle der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde mit der Software „Photoshop 7.0“ bzw. „Photoshop CS4“ (beide von Adobe) sowie mit ImageJ durchgeführt.

2.8 Statistik

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten ziliärer Proteine wurde mit ImageJ realisiert. Für alle Axonem- bzw. Membran-assoziierten Proteine (Arl13b, Sstr3, Rpgr, Ift88) wurden die durchschnittlichen Pixelintensitäten („Mean Gray Value“) innerhalb des

Bereichs des acetylierten α-Tubulins (Referenz) gemessen. Bei den restlichen Proteinmessungen (in der TZ, am Basalkörper oder in der Zilienspitze) wurde die totale Pixelintensität („RawIntDen") verrechnet. Weiterhin wurde bei beiden Messmethoden die umliegende Hintergrund-Fluoreszenzintensität anhand einer Dreifach-Bestimmung quantifiziert und von der spezifischen Fluoreszenzintensität der ziliären Proteine abgezogen. Pro Ansatz wurden jeweils 10 Zilien ausgemessen, d.h. bei einem n = 5 waren es 50 Zilien. Um die Prozentzahl der Zilien auf MEFs zu quantifizieren, wurde die Zellanzahl mit Hilfe einer DAPI-Färbung in Bezug zur Zilienanzahl gesetzt. Zur Quantifizierung der Zentriolen auf MEFs wurde die Zentriolenanzahl (Zentriolen durch γ-Tubulin angefärbt) in den Basalkörpern der Zilien bestimmt. Für die Zilienlänge von *Ftm*$^{+/+}$- und *Ftm*$^{-/-}$-MEFs wurden jeweils 20 Zilien (n = 5) gemessen. Für die Zilienlänge von *Ftm*$^{+/+}$-MEFs (DMSO-behandelt (Kontrolle) und MG132-behandelt) wurden jeweils 25 Zilien (n = 4) gemessen. Für die Zilienlänge von *Ftm*$^{+/+}$- und *Ftm*$^{-/-}$-Gliedmaßen wurde die Länge von jeweils 133 Zilien (n = 3) auf Gefrierdünnschnitten von Gliedmaßen gemessen.

Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Prüfung auf Signifikanz der Fluoreszenzintensitäten ziliärer Proteine, der Zilienlängen, der Prozentzahl von Zentriolen und Zilien, der Gli3-Gesamtproteinmenge, der Sufu-Totalproteinmenge und der *Gli3*-mRNA-Expressionsmenge zwischen wildtypischen und *Ftm*-homozygot mutanten MEFs oder Gliedmaßenzellen wurde mit Hilfe der student`schen *t*-Verteilung durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant (ein Sternchen), ein p-Wert von <0,01 als statistisch sehr signifikant (zwei Sternchen) und ein p-Wert von <0,001 als statistisch hochsignifikant (drei Sternchen) definiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ftm ist in der TZ von MEFs lokalisiert

Frühere Analysen zeigen, dass Ftm am Basalkörper von Zilien diverser Gewebe lokalisiert ist (Delous *et al.*, 2007; Vierkotten, 2006; Vierkotten *et al.*, 2007). Neuere Studien demonstrieren, dass es sich bei Ftm auch um ein Protein der ziliären TZ handeln könnte (Czarnecki und Shah, 2012; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Als TZ wird der Bereich einer Zilie definiert, der vom benachbarten Basalkörper und dem proximalen Teil des Axonems begrenzt wird (siehe Abschnitt 1.3.3). Detaillierte Dreifach-Immunofluoreszenzanalysen in primären Mausfibroblasten (MEFs) zeigen, dass Ftm distal des Basalkörper (durch γ-Tubulin markiert) liegt und mit dem durch acetyliertes α-Tubulin angefärbten, proximalen Teil des Axonems überlappt (Abbildung 3.1 A). Diese Lokalisierung entspricht der TZ in MEFs. Ergänzende Immunofluoreszenzstudien von Ftm mit dem Transitionszonenmarker Cep290 (Craige *et al.*, 2010) lassen aufgrund deckungsgleicher Fluoreszenzsignale eine eindeutige Kolokalisierung beider Proteine erkennen (Abbildung 3.1 B) und manifestieren somit die Zugehörigkeit von Ftm zu den TZ-Proteinen.

Das murine Ftm wird durch drei funktionelle Proteindomänen charakterisiert: N-terminal befinden sich fünf Coiled-coil-Domänen (CC1-CC5), gefolgt von zwei C2-Domänen (C2 1 und C2 2) und abschließend terminiert eine RID-Domäne das Protein (Abbildung 3.1 C). Um herauszufinden, welche Domänen Ftm für die Lokalisierung am Zentrosom benötigt, wurden FLAG-tag markierte Domänenfragmente in wildtypischen MEFs exprimiert und deren subzelluläre Lokalisierung am Zentrosom transfizierter Zellen untersucht (Abbildung 3.1 C). Die Analysen haben ergeben, dass die CC-Domänen entscheidend sind, um Ftm am Zentrosom zu verankern. Weder die C2, noch die RID-Domäne haben die biochemische Fähigkeit am Zentrosom zu akkumulieren, beide zeigen lediglich eine ektopische Verteilung im Zytoplasma.

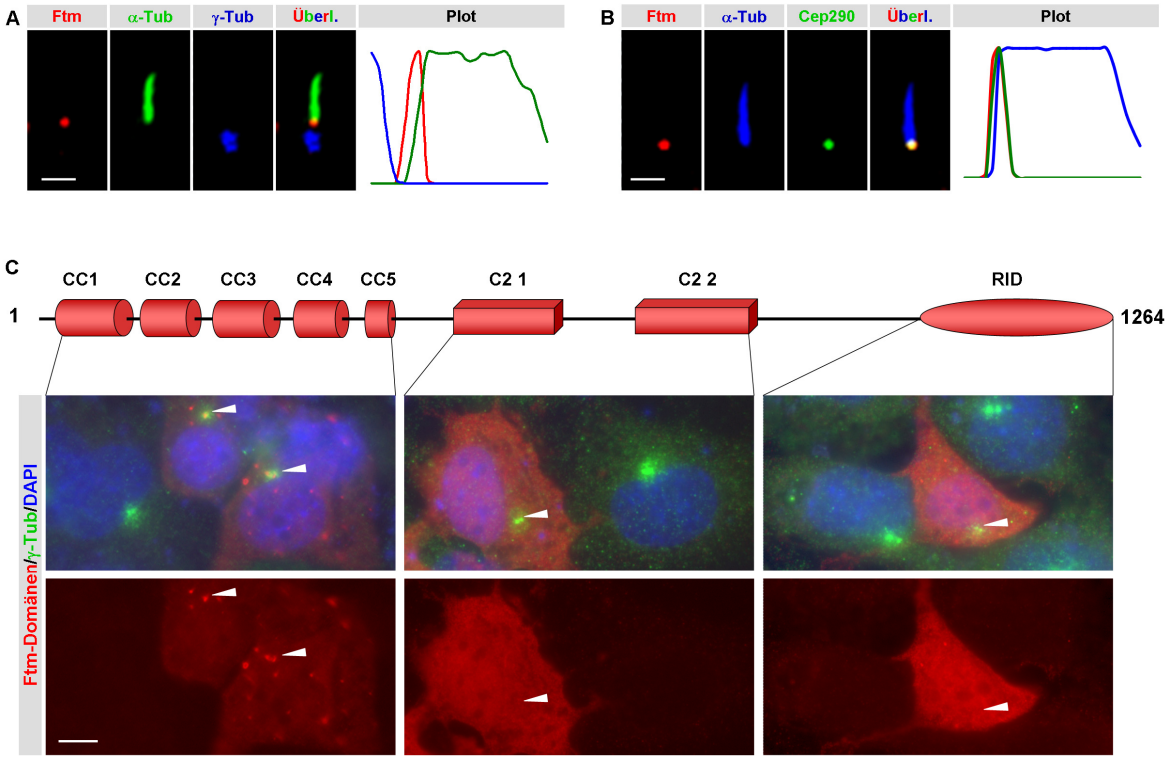

Abbildung 3.1: Ftm ist ein TZ-Protein und benötigt seine CC-Domänen, um am Zentrosom zu lokalisieren.

(A-C) Immunofluoreszenz auf MEFs isoliert aus E12.5-Embryonen. Die Maßstabsbalken (in weiß) repräsentieren eine Länge von 1 µm (A, B) bzw. von 2 µm (C). (A) Das ziliäre Axonem ist durch acetyliertes α-Tubulin in grün und der Basalkörper durch γ-Tubulin in blau angefärbt. Ftm (rote Färbung) ist am proximalen Ende des Axonems lokalisiert; das Signal überlappt mit acetyliertem α-Tubulin, jedoch nicht mit γ-Tubulin. (B) Das ziliäre Axonem ist durch acetyliertes α-Tubulin in blau und die TZ durch Cep290 in grün markiert. Ftm (rote Färbung) kolokalisiert mit Cep290 in der TZ. (A, B) Plots illustrieren die relative Fluoreszenzintensität jedes markierten Proteins vom Basalkörper bis zur Zilienspitze. (C) Die schematische Darstellung von Ftm illustriert, dass das Protein aus 1264 Aminosäuren besteht und fünf Coiled-coil-Domänen (CC1-CC5), zwei C2-Domänen (C2 1, C2 2) und eine RID-Domäne enthält. Die Immunofluoreszenzaufnahmen zeigen Zentrosomen in grün (markiert mit γ-Tubulin) und Zellkerne in blau (mit DAPI angefärbt). Die Transfektion der drei Ftm-Domänenfragmente (CC1-CC5, C2 1+ C2 2 und RID, jeweils rote Färbung) demonstriert, dass nur die CC-Domänen die biochemische Fähigkeit haben sich am Zentrosom von MEFs anzulagern. Weiße Pfeilköpfe markieren die Zentrosomen.

3.2 Der Verlust von Ftm führt zu einer verminderten TZ-Lokalisierung zahlreicher Nphp-Proteine

Jüngste Studien führten zu der Erkenntnis, dass es mehrere Multiproteinkomplexe in der TZ von Zilien gibt: das Nphp1-4-8-Modul, das Nphp5-6-Modul, das Mks/B9-Modul und das Inversin-Kompartiment. Die neuste Modellvorstellung der TZ postuliert eine hierarchische Anordnung aller Komplexe. Je nachdem an welcher Position eines Moduls ein Protein steht, wirkt sich sein Verlust mehr oder weniger gravierend auf die Integrität der TZ aus. Im Nematoden *C. elegans* konnte bereits gezeigt werden, dass Ftm eine zentrale Organisator-Funktion ausübt (Williams *et al.*, 2011). Es steht dort an der Spitze der Hierarchie und kontrolliert die Lokalisierung aller Modul-Proteine in der TZ. Basierend auf diesen Analysen stellte sich die Frage, ob Ftm auch in Säugetierzellen die TZ-Organisation reguliert und somit an der Spitze der TZ-Hierarchie agiert. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Proteinmengen verschiedener Stellvertreter aller TZ-Module mittels Immunofluoreszenz-Intensitätsmessung in der An- und Abwesenheit von Ftm bestimmt. Diese Analysen wurden in MEFs durchgeführt, die der *in vivo*-Situation als Primärzellen sehr nahe kommen. Da angenommen wird, dass Ftm zusammen in einem Modul mit Nphp1 und Nphp4 agiert, wurden zunächst diese internen Komplexpartner analysiert. Die Abbildungen 3.2 A und B demonstrieren, dass Nphp1 und Nphp4 in der TZ wildtypischer Zilien lokalisieren. Beide Proteine liegen distanziert vom Basalkörper und überschneidend mit dem ziliären Axonem vor. In *Ftm*-negativen Zellen zeigen sowohl Nphp1 als auch Nphp4 eine signifikant reduzierte Lokalisierung in der TZ. Die statistische Ausmessung der Fluoreszenzintensitäten wurde im angrenzenden Säulendiagramm illustriert und verdeutlicht, dass in der TZ höchstens 18% der Nphp1- und 21% der Nphp4-Proteinmengen detektiert werden kann. Resultierend daraus kann vermutet werden, dass Ftm ein zentraler Organisator des Nphp1-4-8-Komplexes ist.

Nächstfolgend wurden Proteine aus dem Nphp5-6-Modul und dem Inversin-Kompartiment untersucht. Wie zuvor erwähnt, ist Cep290 (auch Nphp6 genannt) ein spezifischer Transitionszonenmarker, der zusammen mit Nphp5 ein Modul in der TZ bildet. Da Cep290 eine dominierende Funktion im eigenen Komplex eingeräumt wird (Sang *et al.*, 2011), wurde sein Bezug zu Ftm genauer beleuchtet (Abbildung 3.2 C). Es stellte sich heraus, dass das Protein eine signifikant verminderte TZ-Lokalisierung in *Ftm*-homozygot mutanten Zellen aufzeigt (64%).

Der Hauptbestandteil des Inversin-Kompartiments ist das namensgebende Invs, auch als Nphp2 bekannt. In den meisten Zilientypen verteilt sich das Protein vom Basalkörper über

die TZ bis in das distale Axonem hinein (Otto *et al.*, 2003; Shiba *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2005). In den hier untersuchten, wildtypischen MEFs konnte jedoch kein axonemales Verbreitungsmuster wahrgenommen werden (Abbildung 3.2 D). Die spezifische Färbung des Proteins beschränkt sich lediglich auf die TZ. Nichtsdestotrotz ist ersichtlich, dass das Fehlen von Ftm eine signifikante Reduzierung der Invs-Proteinmenge zur Folge hat (54%). Beachtlich ist, dass prozentual betrachtet weder Cep290 noch Invs eine vergleichbar starke Proteinmengenerniedrigung aufzeigen, wie sie bei Nphp1 und Nphp4 vernehmbar ist. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Ftm nicht nur im Nphp1-4-8-Modul eine hochrangige Position einnimmt, sondern dass es auch modulübergreifend als Proteinankergerüst für andere Komplexe fungiert.

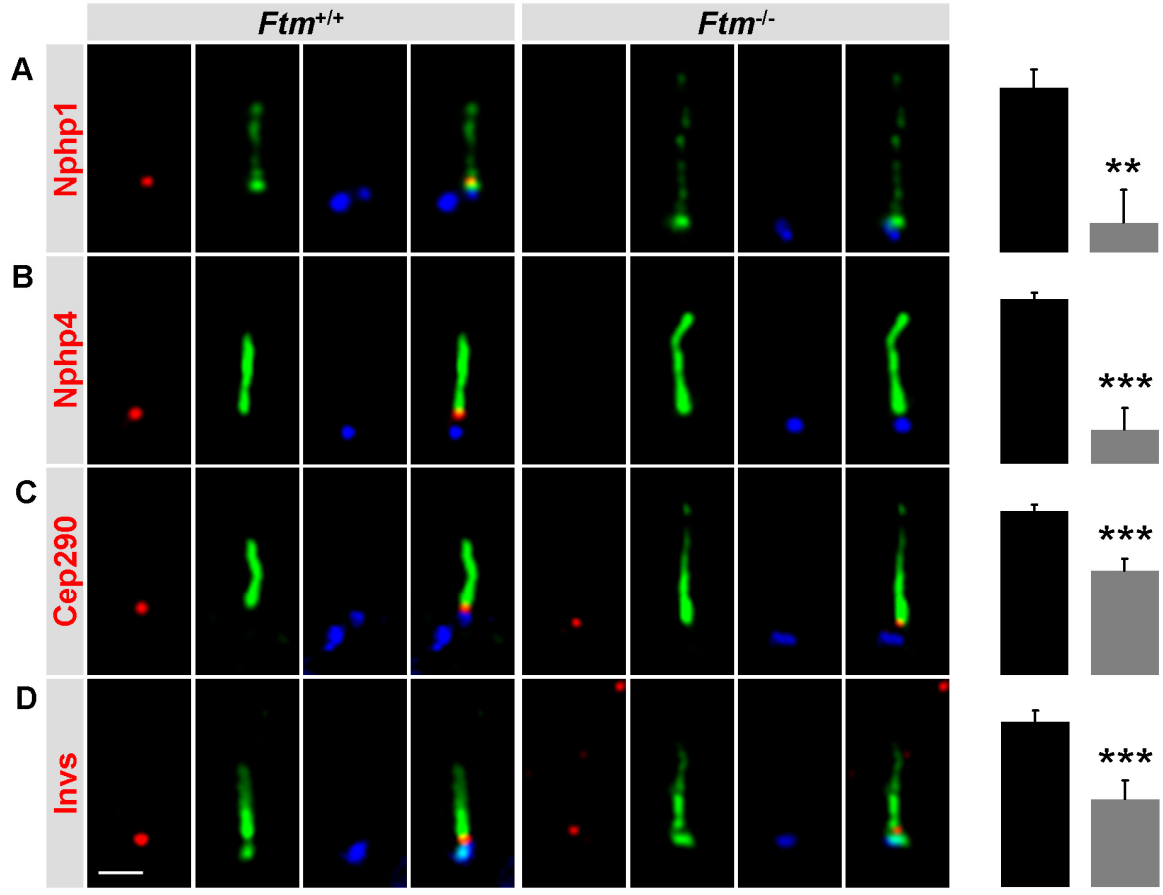

Abbildung 3.2: Signifikante Reduktion der Nphp-Proteine in der ziliären TZ von *Ftm*-defizienten MEFs.

(A-D) Immunofluoreszenz auf MEFs aus E12.5-Embryonen (für beide Genotypen gilt n = 5). Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Das ziliäre Axonem wurde durch acetyliertes α-Tubulin (B-D) in grün angefärbt. (A) Im Fall von Nphp1 wurde als Axonem-Marker Ift88 verwendet, da die Kombinatorik der Antikörper die Verwendung von acetyliertem α-Tubulin ausschließt. (A-D) Der Basalkörper wurde durch γ-Tubulin in blau markiert. Alle gemessenen Proteine sind in rot dargestellt und ihre relative Fluoreszenzintensität ist in den Säulendiagrammen

illustriert. Die Nphp1-, Nphp4-, Cep290- und Invs-Proteinmengen sind in der TZ *Ftm*-negativer MEFs signifikant herabgesetzt (Nphp1: p = 0,001670796; Nphp4: p = 8,65554E-08; Invs: p = 0,0008509; Cep290: p = 0,000026096).

Um weitere Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob die Organisator-Funktion von Ftm *in vivo* ebenfalls eine derartig essentielle Bedeutung für die TZ-Lokalisierung der Nphp-Module hat, wurden ausgewählte Nphp-Proteine in wildtypischen und *Ftm*-negativen E12.5-Gliedmaßenzilien analysiert (Abbildung 3.3 A, B). Es konnte verifiziert werden, dass der Verlust von Ftm die Lokalisierung von Nphp4 und Cep290 auch in Gliedmaßenzilien negativ beeinflusst. Beide Proteine weisen in der *Ftm*-defizienten TZ eine reduzierte Lokalisierung auf. Somit lässt sich die Vermutung anstellen, dass Ftm auch *in vivo* als Komplexregulator fungiert.

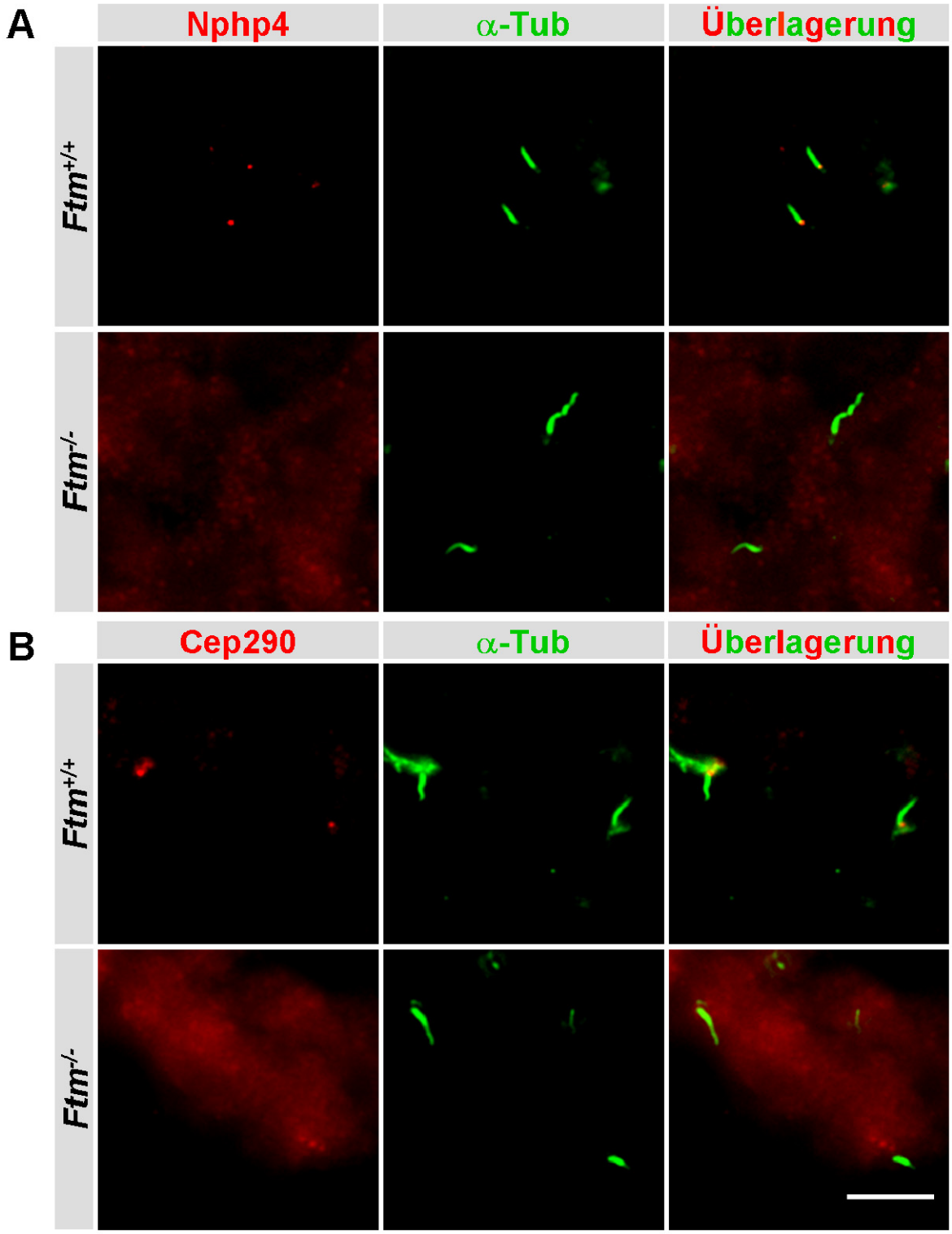

Abbildung 3.3: Die Nphp4- und Cep290-Proteinmenge ist in der TZ *Ftm*-negativer Gliedmaßenzilien reduziert.

(A, B) Immunofluoreszenz auf wildtypischen und *Ftm*-defizienten Gliedmaßenschnitten von E12.5-Embryonen (jeweils n = 3). Das ziliäre Axonem wurde in grün mit acetyliertem α-Tubulin angefärbt. Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 5 µm. (A) Nphp4 (rote Färbung) zeigt eine reduzierte Lokalisierung in *Ftm*$^{-/-}$-Gliedmaßenzilien. (B) Die ziliäre Proteinmenge von Cep290 (rot markiert) ist in *Ftm*-homozygot mutanten Gliedmaßenzilien

herabgesetzt. (A, B) Um das schwache Signal beider Proteine in der *Ftm*-negativen Situation zu verdeutlichen, wurde die Belichtungszeit soweit heraufgesetzt, dass der Färbungshintergrund im roten Kanal deutlich sichtbar wurde.

3.3 Das Mks/B9-Modul wird unabhängig von Ftm organisiert

Vorangegangene Versuche in *C. elegans* demonstrieren, dass Ftm dort ebenfalls der wichtigste bislang bekannte Regulator des Mks/B9-Moduls ist (Williams *et al.*, 2011). Angelehnt an diese Analysen galt es als nächsten Schritt, repräsentative Proteine aus dem Mks/B9-Modul in Säugetierzellen auf ihre Abhängigkeit von Ftm hin zu überprüfen. Mks1 und Tmem67 sind zwei etablierte Mks/B9-Mitglieder der TZ in Nematoden und Säugetieren. Untersucht man die subzelluläre Lokalisierung beider Proteine in MEFs, stellt man zunächst fest, dass während Tmem67 in der TZ aufzufinden ist, Mks1 eine Basalkörper-assoziierte Verteilung demonstriert (Abbildung 3.4 A, B). Es ist ersichtlich, dass weder Tmem67 noch Mks1 eine veränderte Immunofluoreszenzintensität in *Ftm*-defizienten Zellen zeigen.

Ein weiteres Mitglied aus dem Mks/B9-Modul stellt B9d1 dar. Dabei handelt es sich um ein in die Ziliogenese involviertes Protein. B9d1 zeigt zwar eine reduzierte Proteinmenge in der TZ *Ftm*-negativer Zilien (39%), jedoch ist diese nicht signifikant herabgesetzt (Abbildung 3.4, C). Um abschließend eine klare Aussage machen zu können, ob Ftm für das Mks/B9-Modul von Bedeutung ist, wurde schließlich noch die Lokalisierung drei verschiedener Tectonic-Proteine (Tctn1-3) beleuchtet, deren Zugehörigkeit zum Mks/B9-Modul bereits in murinen Zilienanalysen dargelegt wurde (Abbildung 3.4 D-F) (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Der Verlust von Ftm hat in MEFs keinerlei Auswirkung auf die Lokalisierung aller Tctn-Proteine. Somit kann resümiert werden, dass Ftm anders als in *C. elegans* nicht für die Organisation des Mks/B9-Moduls in Säugetierzellen verantwortlich ist.

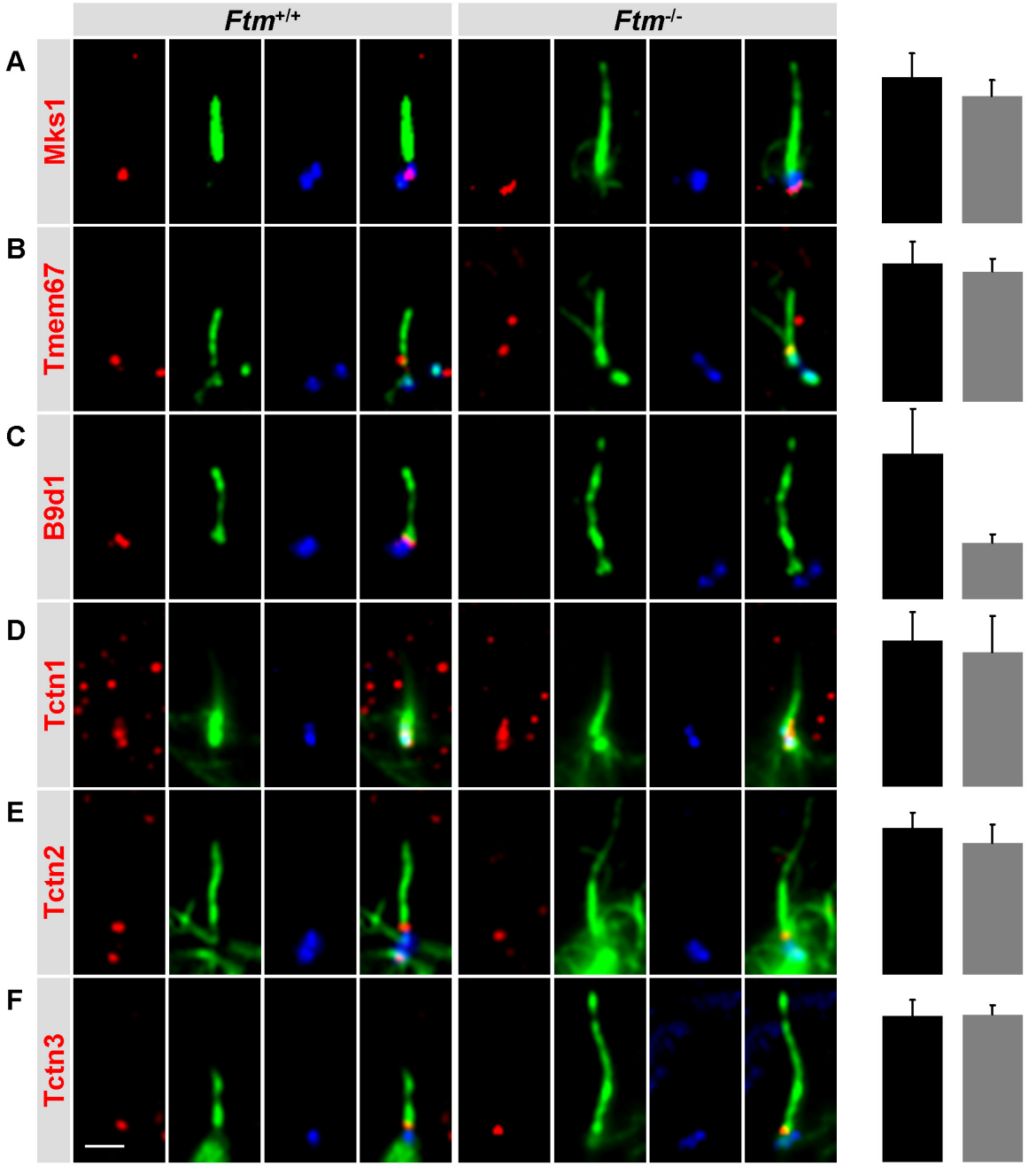

Abbildung 3.4: Die Proteinmenge von Mks/B9-Modulkomponenten wird durch eine Ftm-Defizienz nicht modifiziert.

(A-F) Immunofluoreszenz auf MEFs. Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Das ziliäre Axonem wurde durch acetyliertes α-Tubulin (A, B, D-F) in grün angefärbt. (C) Im Fall von B9d1 wurde als Axonem-Marker Ift88 verwendet, da die Kombinatorik der Antikörper die Verwendung von acetyliertem α-Tubulin ausschließt. (A-F) Der Basalkörper wurde durch γ-Tubulin in blau markiert. Alle gemessenen Proteine sind in rot dargestellt und ihre relative Fluoreszenzintensität ist in den Säulendiagrammen illustriert. Die MEFs wurden aus E12.5-Embryonen generiert (für beide Genotypen gilt n = 5). (A, B) Die Proteinmengen von Mks1 und Tmem67 zeigen keine Veränderung basierend auf einer Ftm-Defizienz (Mks1: p = 0,51141061;

Tmem67: p = 0,76300403). (C) Die Lokalisierung von B9d1 ist in *Ftm*-negativen MEFs tendenziell, jedoch nicht signifikant verändert (p = 0,08180695). (D-F) Alle Tctn-Proteine (Tctn1-3) können unabhängig von Ftm in der TZ von Zilien detektiert werden (Tctn1: p = 0,6041129; Tctn2: p = 0,5036252; Tctn3: p = 0,9371958).

3.4 Die Proteinmenge des Ftm-verwandten Rpgrip1 ist in Abwesenheit von Ftm erhöht

Um die Positionierung von Ftm in der ziliären Hierarchie präziser definieren zu können, wurden auch Proteine untersucht, die eine Ftm-gleichgestellte oder -übergeordnete Funktion ausüben könnten. Cspp1 ist ein Kandidat, für den bereits veröffentlicht wurde, dass es als Ftm-Interaktionspartner für dessen Lokalisierung an der ziliären Basis von hTERT-RPE1-Zellen benötigt wird (Patzke *et al.*, 2010). Um zu testen, ob eine Ftm-Defizienz auch die Lokalisierung des Cspp1-Proteins beeinträchtigt, wurde dessen Proteinmenge in MEFs bestimmt (Abbildung 3.5 A). Bei der Untersuchung beider Genotypen stellte sich heraus, dass Cspp1 sowohl am Basalkörper, als auch in der TZ detektiert werden kann und dass es auch unabhängig von Ftm in der TZ verankert ist. Somit scheint es, als ob sich Cspp1 über Ftm in der Hierarchie der TZ-Proteine positioniert.

Ein weiterer Kandidat, von dem vermutet wird, dass es eine Ftm-übergeordnete Funktion ausüben könnte, ist Septin2 (Sept2). Es gehört zu einer Familie von Guanosin-Triphosphatasen, die an der Basis ziliärer Membranen eine Diffusionsbarriere generieren und somit über die Membranproteinkomposition von Zilien entscheiden (Abschnitt 1.8). In wildtypischen MEFs konnte eine halbkreisförmige Sept2-Färbung in der TZ beobachtet werden (Abbildung 3.5 B). Diese entspricht aktuellen Publikationen, welche zeigen, dass Sept2 in einer Membran-assoziierten Ringstruktur verteilt vorliegt. Die Analyse der Proteinmenge in der TZ ergab, dass eine Ftm-Defizienz die Lokalisierung von Sept2 nicht beeinflusst.

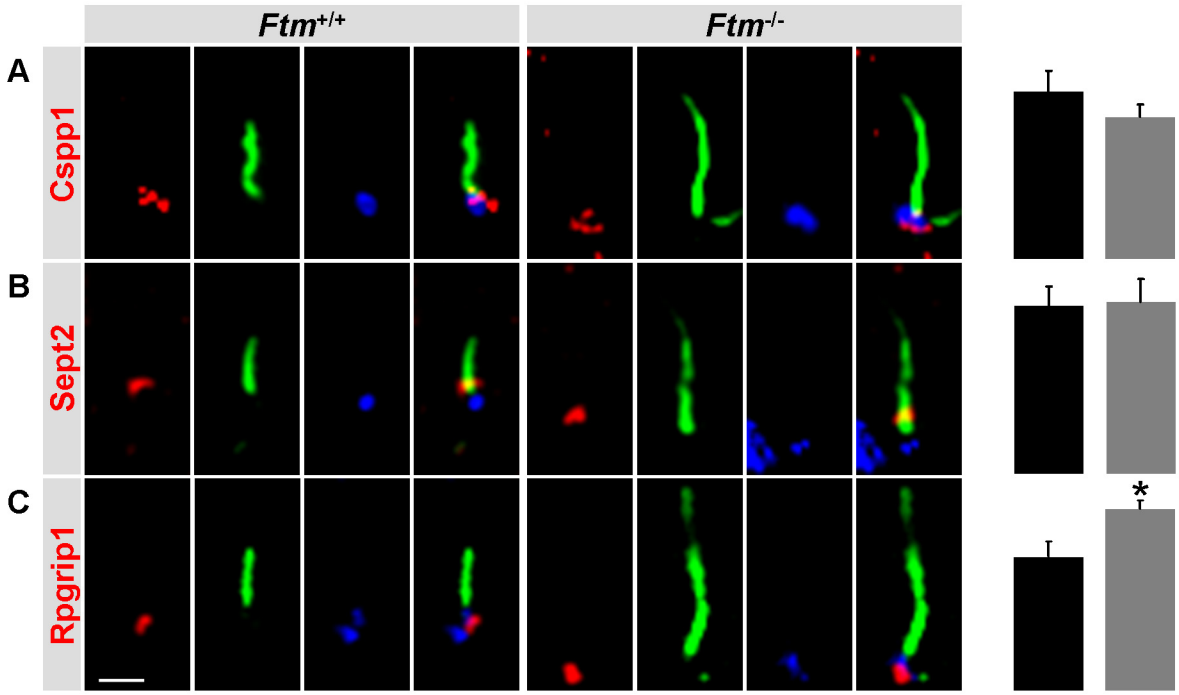

Abbildung 3.5: Während Cspp1 und Sept2 unabhängig von Ftm in der TZ lokalisieren, steigt die Rpgrip1-Proteinmenge bei Ftm-Verlust signifikant an.

(A-C) Immunofluoreszenz auf MEFs. Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Das ziliäre Axonem wurde durch acetyliertes α-Tubulin in grün und der Basalkörper durch γ-Tubulin in blau markiert. Alle gemessenen Proteine sind in rot dargestellt und ihre relative Fluoreszenzintensität ist in den Säulendiagrammen illustriert. (A, B) Die MEFs wurden aus n = 5 und (C) n = 4 Embryonen (E12.5) generiert. (A, B) Die Proteinmengen von Cspp1 und Sept2 stellen sich in der *Ftm*-negativen TZ als unverändert dar (Cspp1: p = 0,28935787; Sept2: p = 0,8894704). (C) Rpgrip1 zeigt eine signifikant erhöhte Lokalisierung an der Basis *Ftm*-defizienter Zilien (p = 0,04365251).

Wenn man sich mit Ftm-gleichgestellten oder -übergeordneten Proteinen auseinandersetzt, muss abschließend noch ein weiteres Protein analysiert werden. Hierbei handelt es sich um das Ftm-verwandte Protein Rpgrip1. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Funktionen von Rpgrip1 und Ftm gewebeabhängig überschneiden können (Patil *et al.*, 2012). Auch ist bekannt, dass die zwei verwandten Proteine miteinander interagieren. Speziesabhängig kann Rpgrip1 wahlweise am Basalkörper, in der TZ oder im Axonem von Zilien detektiert werden (Mavlyutov *et al.*, 2002). In den hier untersuchten, wildtypischen MEFs ist Rpgrip1 am Basalkörper und nicht in der TZ lokalisiert (Abbildung 3.5 C). Es kann eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge in Abwesenheit von Ftm gemessen werden (135%).

3.5 *Ftm*-negative MEFs weisen eine gestörte Zilienanzahl und -morphologie auf

Bei den vorangegangenen Untersuchungen zur Integrität der TZ stellte sich heraus, dass die Lokalisierung einiger Proteine in der TZ *Ftm*-defizienter MEFs modifiziert ist. Da viele dieser Proteine eine Funktion in der Ziliogenese und beim Erhalt von Zilien innehaben, wurde die Zilienmorphologie *Ftm*-negativer MEFs und Gliedmaßenzellen analysiert. Beide Zilientypen weisen in Abwesenheit von Ftm eine signifikante Verlängerung des Axonems auf (MEFs: 144%, Gliedmaßenzellen: 151%; Abbildung 3.6 A, B). Proportional zur Längenzunahme enthalten $Ftm^{-/-}$-MEF-Zilien eine erhöhte Proteinmenge an acetyliertem α-Tubulin (155%). Zusätzlich wurde auch eine verminderte Zilienanzahl (19%) und eine gesteigerte Zentriolenanzahl (126%) bei Ftm-Verlust detektiert (Abbildung 3.6 A, C). Diese Abberationen deuten darauf hin, dass Ftm nicht nur für die TZ-Integrität wichtig ist, sondern dass es auch in frühere, die Ziliogenese und Morphologie von Zilien betreffende Schritte involviert ist.

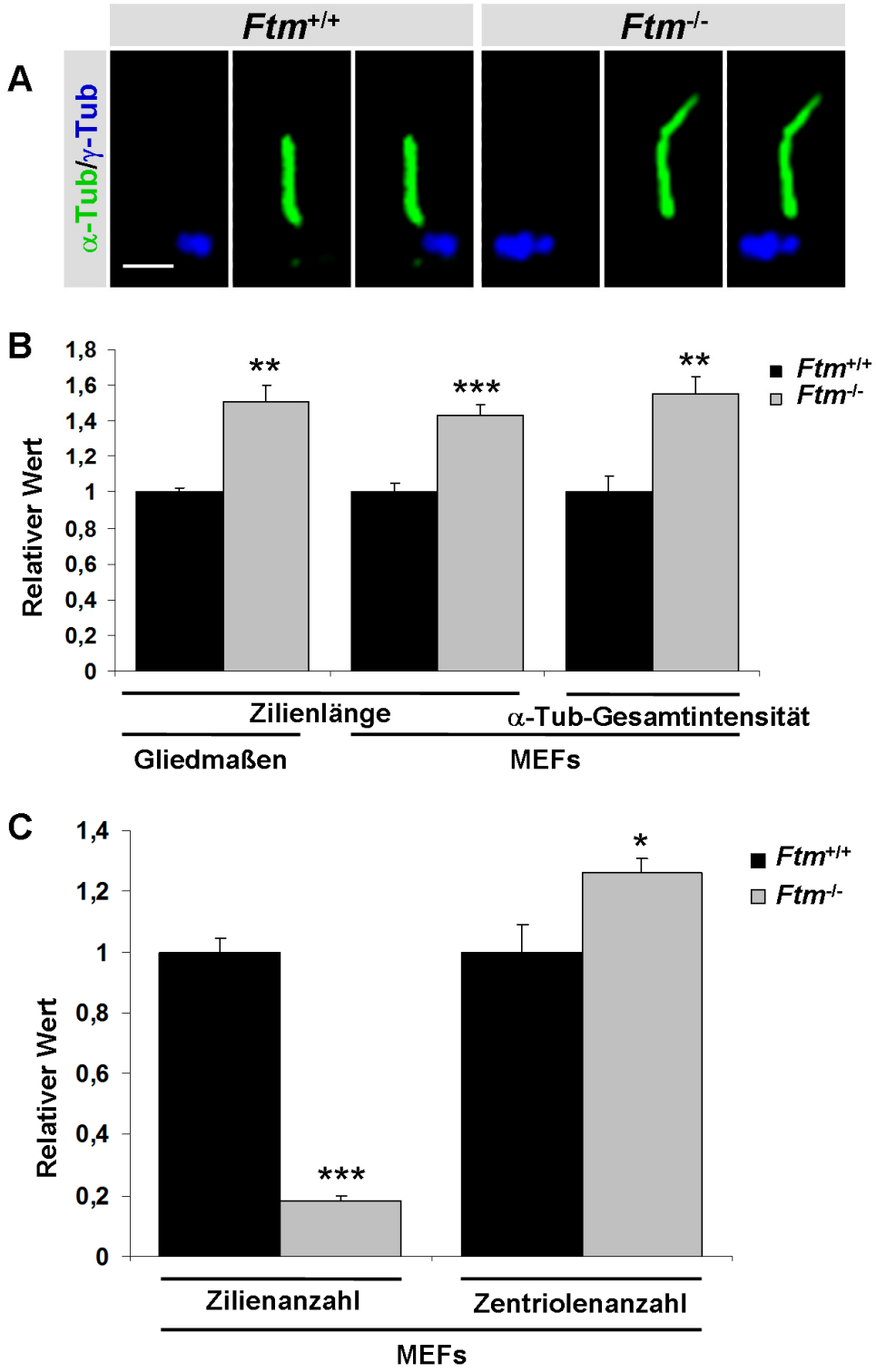

Abbildung 3.6: *Ftm*-negative Mefs zeigen eine veränderte Zilienanzahl und -morphologie auf. (A) Immunofluoreszenz auf MEFs isoliert aus E12.5-Embryonen (n = 5). Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Das ziliäre Axonem wurde durch acetyliertes α-Tubulin in grün und der Basalkörper durch γ-Tubulin in blau gefärbt. (A, B) Die Zilien *Ftm*-negativer MEFs sind signifikant verlängert (p = 0,00041342). (B) Der Vergleich der Zilienlänge von wildtypischen (n = 3) und *Ftm*-defizienten (n = 3) Gliedmaßenzellen zeigt eine signifikante Verlängerung auf (p = 0,00529361). *Ftm*-defiziente MEF-Zilien enthalten eine signifikant erhöhte

Menge an acetyliertem α-Tubulin (p = 0,00237345), die sich proportional zur Länge verhält. (A, C) *Ftm*$^{-/-}$-MEFs (n = 5) weisen eine signifikante Reduktion der Zilienanzahl (p = 5,76352E-05) und eine signifikant erhöhte Zentriolenanzahl auf (p = 0,03100364).

3.6 Reduzierte Lokalisierung Membran- und BBSom-assoziierter Proteine in *Ftm*-negativen Zilien

Wie bereits einleitend erwähnt, ist eine der wichtigsten Aufgaben der TZ den Import und Export von Proteinen in Zilien zu kontrollieren. Da Ftm für die korrekte Lokalisierung von drei der vier bekannten TZ-Module von großer Bedeutung ist, stellte sich die Frage, ob die TZ ihre Funktion als Torwächter in Abwesenheit von Ftm noch kontrolliert ausführen kann. Basierend auf dieser Fragestellung wurden die Immunofluoreszenzintensitäten ausgewählter Membran-, BBSom- und IFT-gekoppelter Proteine in beiden Genotypen verglichen. Sowohl das Membran-assoziierte Proteine Arl13b als auch der Membranrezeptor Somatostatin3 (Sstr3) weisen eine signifikant geschwächte Akkumulierung im *Ftm*-negativen Axonem auf (Arl13b: 45%, Sstr3: 56%; Abbildung 3.7 A, B). Weiterhin wurde Bbs5, ein Bestandteil des BBSoms, auf seine Abhängigkeit von Ftm hin überprüft. Das BBSom ist ein Multiproteinkomplex, welcher in die Ziliogenese und den damit verbundenen ziliären Membrantransport involviert ist. Bbs5 soll ein mit der ziliären Membran-assoziiertes Protein darstellen (Nachury *et al.*, 2007). Andere publizierte Immunofluoreszenzanalysen zeigen jedoch, dass Bbs5 in Fibroblasten eine TZ-Lokalisierung aufzeigt (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). In den hier untersuchten wildtypischen MEFs ist Bbs5 ebenfalls in der TZ lokalisiert, darauf hindeutend, dass dieser Ort wichtig für die Funktion des BBSoms sein könnte (Abbildung 3.6 C). In *Ftm*-defizienten MEFs kann eine signifikant reduzierte Menge an Bbs5 detektiert werden; nur noch 50% des Proteins sind in der TZ vorhanden. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Funktion des BBSoms und somit die Membranproteinkomposition Ftm-abhängig sind.

Ein Protein, das nicht nur als bekannter Ftm-Interaktionspartner fungiert, sondern auch in den ziliären Vesikel-Transport involviert ist, stellt der GTPase-Regulator Rpgr dar. Rpgr lokalisiert gewebeabhängig am Basalkörper, im Axonem oder in der TZ von Zilien (Hong *et al.*, 2003; Khanna *et al.*, 2005; Mavlyutov *et al.*, 2002). In wildtypischen MEFs kann das Protein im Axonem detektiert werden (Abbildung 3.7 D). Durch den Verlust von Ftm wird die Zilienpräsenz von Rpgr negativ beeinflusst (65%). Da Rpgr auch mit IFT-assoziierten Proteinen interagiert, sollte ergänzend festgestellt werden, ob der IFT gestört ist (Khanna *et*

al., 2005). Daher wurde die Proteinmenge von Ift88, einer IFT-B-Komplex-Komponente im Axonem von MEFs bestimmt. Es stellte sich heraus, dass weder die ziliäre Menge noch die Verteilung von Ift88 in *Ftm*$^{-/-}$-Zellen verändert ist (Abbildung 3.7 E und Abbildung 8.2 A im Anhang). Zusammengefasst kann geschlussfolgert werden, dass einige BBSom- und Membran-assoziierte Proteine vermindert in *Ftm*-defizienten MEF-Zilien detektiert werden können, jedoch der anterograde IFT höchstwahrscheinlich unbetroffen ist.

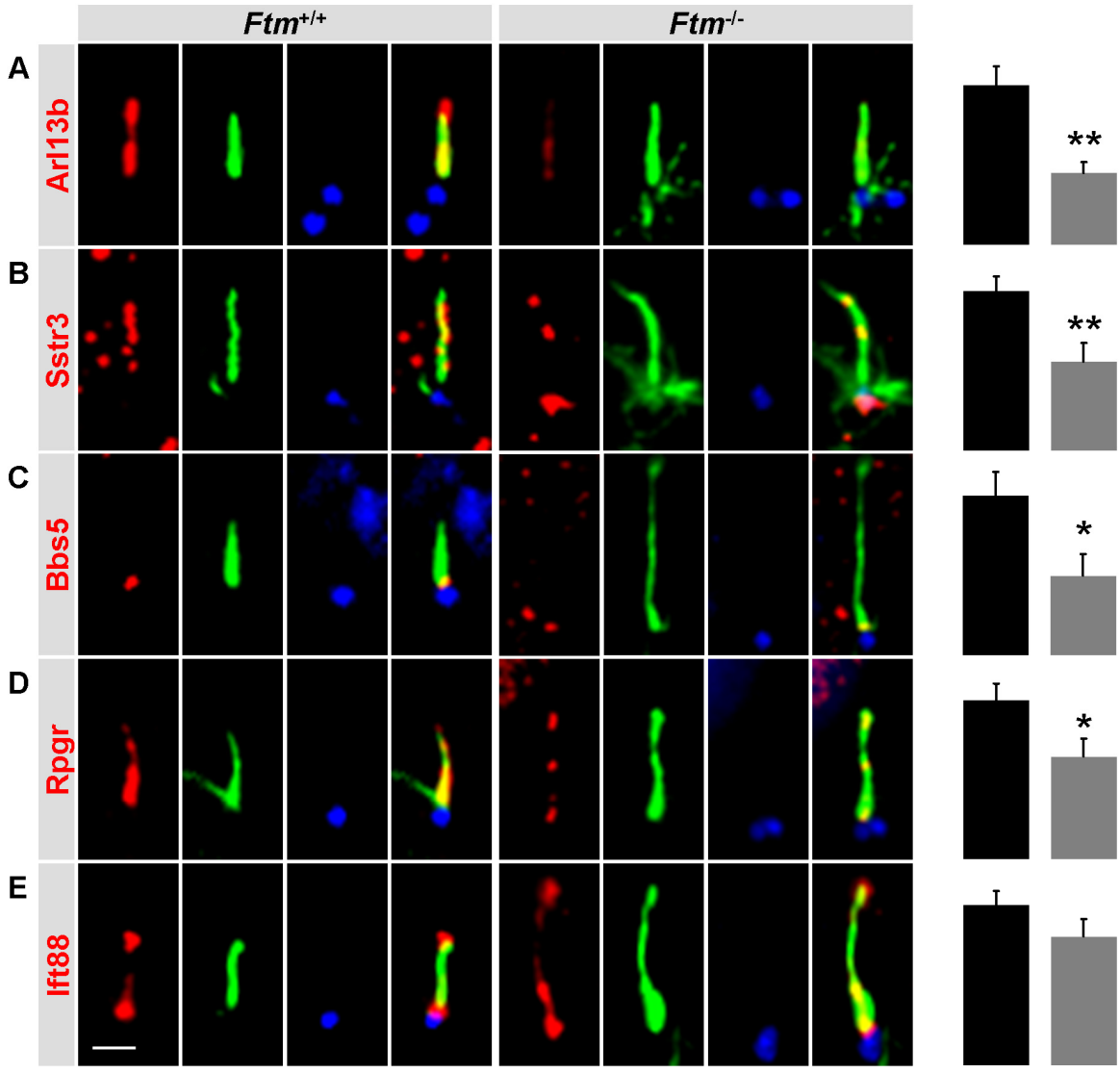

Abbildung 3.7: Die ziliäre Lokalisierung von Arl13b, Sstr3, Bbs5 und Rpgr ist in *Ftm*$^{-/-}$-Zilien signifikant reduziert, während sich die Verteilung von Ift88 unverändert darstellt.

(A-D) Immunofluoreszenz auf MEFs isoliert aus E12.5-Embryonen (für beide Genotypen gilt: Arl13b: n = 4; Sstr3, Bbs5, Ift88: n = 5; Rpgr: n = 6). Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Das ziliäre Axonem wurde durch acetyliertes α-Tubulin in grün und der Basalkörper durch γ-Tubulin in blau markiert. Alle gemessenen Proteine sind in rot dargestellt und ihre relative Fluoreszenzintensität ist in den Säulendiagrammen illustriert. (A) Arl13b zeigt eine signifikant reduzierte Lokalisierung in der ziliären Membran *Ftm*-negativer MEFs (p =

0,00405373). (B) Die Proteinmenge von Sstr3 ist in *Ftm*-homozygot mutanten Zilienmembranen signifikant herabgesetzt (p = 0,00461395). (C) Der Verlust von Ftm resultiert in einer signifikanten Reduktion der Lokalisierung von Bbs5 in der TZ von MEFs (p = 0,02547482). (D) Die Deletion von *Ftm* verursacht eine signifikant reduzierte Lokalisierung von Rpgr im Axonem (p = 0,01950693), hat aber keinerlei Auswirkung auf die ziliäre Proteinmenge von Ift88 (E) (p = 0,14611655).

3.7 Ftm interagiert mit Psmd2, einer Komponente der 19S-Untereinheit des Proteasoms

Da sich herausstellte, dass Ftm auch in Säugetieren ein wichtiger Regulator der TZ ist, war es von Interesse, potentielle Interaktionspartner des Proteins ausfindig zu machen. Dafür wurden wahlweise sowohl die CC-Domänen als auch die C-terminale RID-Domäne von Ftm mit einem FLAG/Strep/HA-Tag gekoppelt und in NIH3T3-Zellen exprimiert (Abbildung 3.8 A). Es folgte eine Tandem-Affinitätsaufreinigung (engl. tandem affinity purification, TAP) und eine anschließende massenspektrometrische Analyse der aufgereinigten Proteinkomplexe, die 119 potentielle Kandidaten identifizierte (siehe Tabelle 8.1 im Anhang, Durchführung der massenspektrometrischen Analysen erfolgte durch Michael Reinartz aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

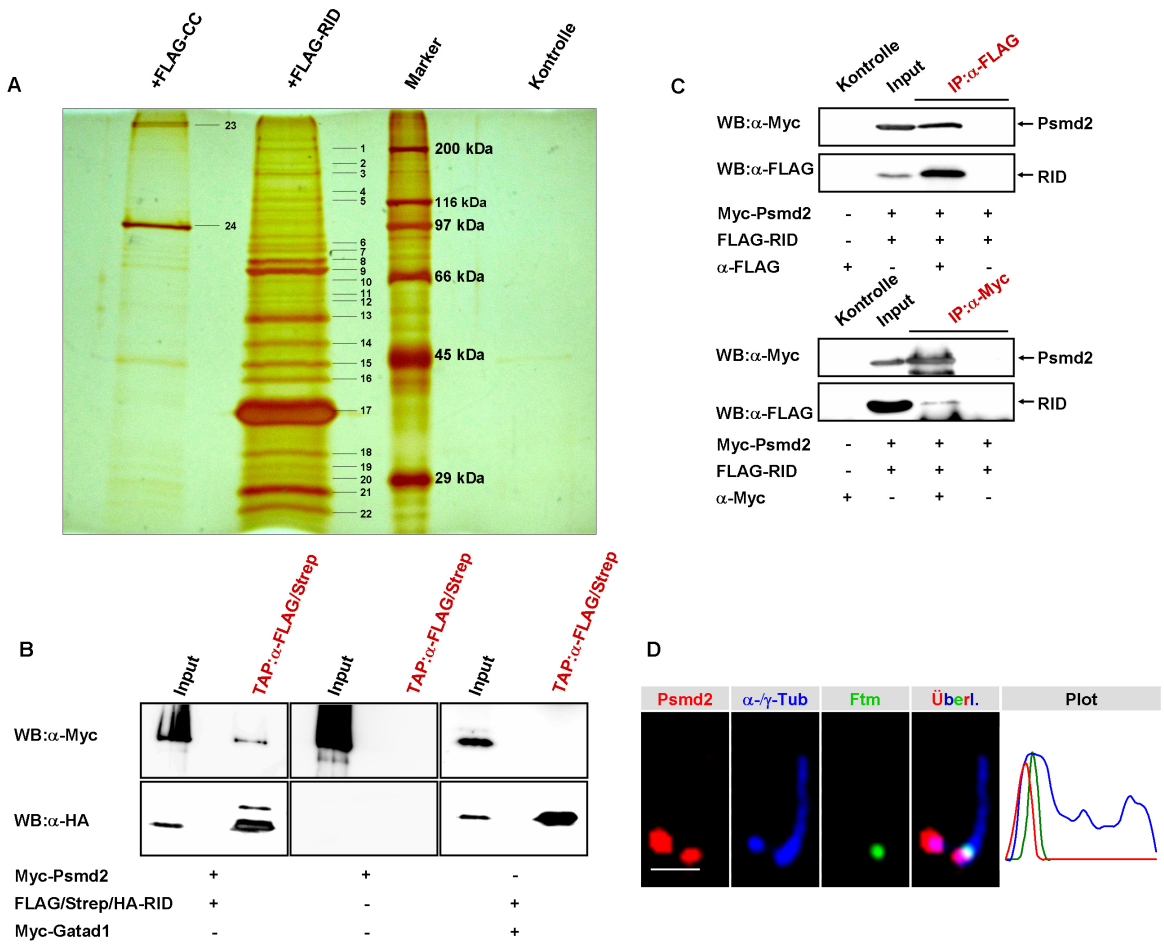

Abbildung 3.8: Ftm interagiert mit Psmd2, einer Komponente der 19S-Untereinheit des Proteasoms.

(A) Mit Hilfe einer TAP-Aufreinigung wurden FLAG/Strep/HA-gekoppelte CC- und RID-Domänen-assoziierte Proteine isoliert. Diese wurden anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels einer Silberfärbung visualisiert. Nach einer massenspektrometrischen Analyse wurden die identifizierten Proteine in Tabelle 8.1 (siehe Anhang) dargestellt. (B) Die FLAG/Strep/HA-gekoppelte RID-Domäne des Ftm-Proteins und das Myc-getaggte Psmd2 wurden in HEK293T-Zellen transient exprimiert und nach einer TAP-Aufreinigung auf eine mögliche Interaktion getestet. Das Myc-getaggte Psmd2 (Bande 2), jedoch nicht die Negativkontrolle Myc-Gatad1 (Bande 6) kann nach der Doppelaufreinigung über das FLAG und Strep-Tag der RID-Domäne detektiert werden. (C) Myc-getaggtes Psmd2 und die FLAG-gekoppelte RID-Domäne von Ftm wurden in einer Koimmunopräzipitation auf eine mögliche Interaktion getestet. Nach einer transienten Expression beider Proteine in NIH3T3-Zellen und einer FLAG-Aufreinigung kann Myc-Psmd2 über FLAG-RID koimmunopräzipitiert werden. Der reziproke Ansatz demonstriert, dass auch die RID-Domäne nach einer Myc-Aufreinigung über Myc-Psmd2 koimmunopräzipitiert werden kann. (D) Immunofluoreszenz auf MEFs isoliert aus E12.5-Embryonen. Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Das ziliäre Axonem und der Basalkörper sind durch acetyliertes α- und γ-Tubulin in blau angefärbt. Ftm (grüne Färbung) ist am

proximalen Ende des Axonems lokalisiert und zeigt eine partielle Kolokalisierung mit dem Basalkörper-assoziierten Psmd2 (rot markiert).

Ein Vergleich mit der Datenbank von Zilienproteomen (www.ciliaproteome.org) zeigt, dass eine überrepräsentative Mehrzahl an Kandidaten in den aufgereinigten Komplexen Zilien-assoziierte Proteine darstellen (72%).

Ein potentieller Ftm-Interaktionspartner, der aus der TAP-Aufreinigung hervorgeht, ist Psmd2, eine Komponente der 19S-Untereinheit des Proteasoms. Interessanterweise wurde dieses Protein bereits zuvor im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere via Hefe-Zwei-Hybrid-System-Analyse als potentieller Ftm-Interaktionspartner identifiziert (Vetter, 2006). Zur Bestätigung der gefundenen Ftm-Psmd2-Interaktion erfolgte eine 2-fache Validierung: eine erneute TAP-Aufreinigung und eine Koimmunopräzipitation. Abbildung 3.8 B zeigt das Ergebnis der TAP-Aufreinigung in der eine Myc-getaggte Volllängenform von Psmd2 mit der FLAG/Strep/HA-getaggten RID-Domäne des Ftm-Proteins in HEK293T-Zellen transient exprimiert wurde. Nach einer sequenziellen Doppelaufreinigung der RID-Domäne über das FLAG- und Strep-Tag konnte Myc-Psmd2, jedoch nicht die Negativkontrolle Myc-Gatad1 nachgewiesen werden. Die Spezifität der Interaktion beider Proteine wurde ergänzend mittels einer Koimmunopräzipitationsanalyse geprüft (Abbildung 3.8 C). Dabei wurde zunächst erneut Myc-Psmd2 mit der FLAG-getaggten RID-Domäne des Ftm-Proteins in NIH3T3-Zellen transient exprimiert. Anschließend wurde das Myc-Psmd2 über eine anti-FLAG-Affinitätsaufreinigung koimmunopräzipitiert. Der reziproke Ansatz konnte weiterhin demonstrieren, dass auch nach einer anti-Myc-Affinitätsaufreinigung FLAG-RID durch Myc-Psmd2 koimmunopräzipitiert wird. Zusammengenommen kann anhand dieser Befunde eine biochemische Bindung der RID-Domäne an das Psmd2-Protein bestätigt werden.

Um die biologische Signifikanz der gefundenen Proteininteraktion weiter zu bestärken, sollte der zelluläre Interaktionsort beider Proteine identifiziert werden. Erste Untersuchungen zeigten eine Lokalisierung von Ftm und Psmd2 an den Zentrosomen von MEFs (Lier, 2008). Ergänzend konnte auch eine partielle Kolokalisierung beider Proteine an der Basis von MEF-Zilien ausfindig gemacht werden (Abbildung 3.8 D).

3.8 Anreicherung von Proteasomsubstraten in *Ftm*-defizienten Zilien

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Ftm zu einer Störung des Shh-Signalwegs führt (Gerhardt, 2010; Lier, 2008; Vierkotten *et al.*, 2007). Dabei stellt sich das Verhältnis der Gli3-190 zu Gli3-83-Isoformen in *Ftm*-negativen Embryonen und Herzen im Vergleich zum Wildtypen als verändert dar. Da Gli3-190 normalerweise durch das Proteasom prozessiert werden sollte, ergab sich bereits früh der Verdacht, dass $Ftm^{-/-}$-Embryonen eine geminderte Proteasomaktivität aufweisen könnten. Die Defizienz des Ftm-Proteins löst auch in Gliedmaßen und MEFs eine signifikante Veränderung des Gli3-190 zu Gli3-83-Verhältnisses aus (Abbildung 3.9 A-D), darauf hindeutend, dass es sich um einen gewebeübergreifenden Effekt handelt. Additiv konnte in den MEFs auch eine Erniedrigung der Gli3-83-Menge erfasst werden.

Ob die signifikante Erhöhung der Gli3-190-Proteinmenge auf einer verstärkten Transkription des *Gli3*-Gens basiert, wurde mittels einer Real-time-PCR-Untersuchung getestet. Wie in Abbildung 3.9 E dargestellt, lässt sich keine signifikant erhöhte *Gli3*-Transkription in *Ftm*-negativen Gliedmaßen (E12.5) detektieren. Folglich muss der Grund für den Gli3-190-Überschuss auf Proteinebene liegen.

Da bekannt ist, dass das Gli3-Volllängenprotein über einen Komplex mit Sufu stabilisiert wird, war es von Interesse zu prüfen, ob auch dieses Protein in *Ftm*-defizienten Gliedmaßen im Überschuss vorliegt. Die Analyse der Sufu-Proteinmenge beider Genotypen konnte diese Annahme bestätigen. In *Ftm*-homozygot mutanten Gliedmaßen liegt eine Erhöhung um 136% vor (Abbildung 3.9 F, G).

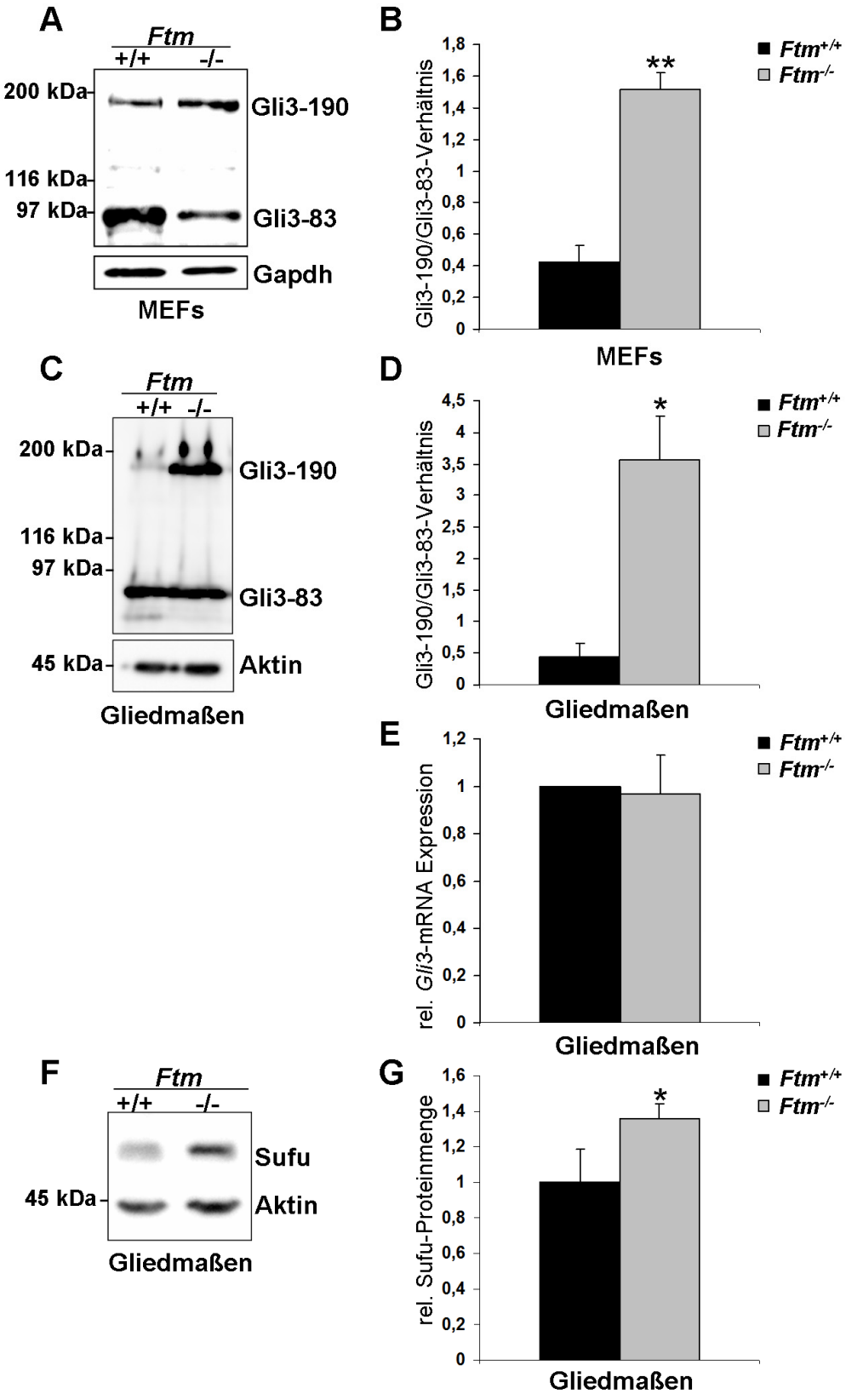

Abbildung 3.9: Der Verlust von Ftm verursacht eine gestörte Gli3-Prozessierung und eine erhöhte Sufu-Proteinmenge, ohne jedoch die *Gli3*-Transkription zu beeinflussen.

(A, C, F) Western Blot-Analysen in (A) MEFs isoliert aus E12.5-Embryonen (für beide Genotypen gilt n = 3) oder (C, F) Gliedmaßen von E12.5-Embryonen (für beide Genotypen gilt n = 3). Gapdh

(A) und Aktin (C, F) fungieren als Ladekontrolle. (A) In *Ftm*-defizienten MEFs weist sowohl eine erhöhte Gli3-190 als auch eine erniedrigte Gli3-83-Proteinmenge auf einen Prozessierungsdefekt hin. (B) Das Verhältnis beider Isoformen ist um das 3,6-fache in $Ftm^{-/-}$-MEFs signifikant erhöht ($p = 0{,}00205992$). (C) In *Ftm*-negativen Gliedmaßen ist eine erhöhte Menge an Gli3-190 wahrzunehmen. (D) Das Verhältnis von Gli3-190 zu Gli3-83 illustriert eine 8,1-fache Erhöhung in *Ftm*-homozygot mutanten Gliedmaßen ($p = 0{,}03611623$). (E) Real-time-Analyse von wildtypischen ($n = 3$) und *Ftm*-defizienten ($n = 3$) Gliedmaßen aus E12.5-Embryonen. Die Transkription des *Gli3*-Gens bleibt bei Verlust von Ftm unverändert ($p = 0{,}16263455$). (F) In $Ftm^{-/-}$-Gliedmaßen kann eine signifikant erhöhte Sufu-Proteinmenge detektiert werden. (G) *Ftm*-homozygot mutante Gliedmaßen enthalten 1,4-fach mehr Sufu-Protein als vergleichbare Wildtypen ($p = 0{,}01635027$).

Nächstfolgend galt es die Frage zu klären, wo in der Zelle die zusätzliche Gli3-Proteinmenge aufzufinden ist. Normalerweise ist dieses Protein nach der Aktivierung des Shh-Signalwegs in der Spitze von Zilien und im Zellkern zu detektieren. In MEFs kann eine geringe Gli3-Proteinmenge auch ohne Induktion der Kaskade in der Zilienspitze ausgemacht werden (Chen *et al.*, 2009). Erste Immunofluoreszenz-Intensitätsmessungen beider Isoformen des Gli3-Proteins in *Ftm*-negativen Zilien offenbarten, dass sich die erhöhte Gli3-Proteinmenge im Axonem der Zilien ansammelt (182%; Abbildung 3.10 A). Weitere Färbungen mit einem Antikörper ausschließlich gegen die Gli3-190-Isoform bestätigten, dass es sich bei der Akkumulierung in der Zilie auch vorwiegend um die Volllänge des Proteins handelt (166%; Abbildung 3.10 B). Zieht man zusammenfassend in Betracht, dass die Erhöhung von Gli3 auf der Proteinebene basiert und ein potentieller Interaktionspartner von Ftm eine Komponente der 19S-Untereinheit des Proteasoms darstellt, erhärtet sich der Verdacht, dass Ftm für die Regulation der Proteasomaktivität wichtig sein könnte.

Da das Proteasom nicht nur für die Prozessierung von Gli3-190 zuständig ist, sondern für die Degradierung vieler Proteine sorgt, sollte anschließend geprüft werden, ob sich auch andere Proteasomsubstrate in *Ftm*-homozygot mutanten MEFs anreichern. Demzufolge wurde die Fluoreszenzintensität von potentiellen Proteasomsubstraten wie der am Serin 33, 37 oder Threonin 41 phosphorylierten Form des β-Catenins (p-β-Catenin), Sufu und ubiquitinierten Proteinen (Ubiquitin) an der Zilie in Abhängigkeit von Ftm gemessen (Abbildung 3.10 C-E). Alle Proteine können in $Ftm^{-/-}$-MEFs als erhöht erfasst werden (p-β-Catenin: 131%, Sufu: 129%, Ubiquitin: 200%). Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Verlust von Ftm die Proteasomaktivität herabsetzt.

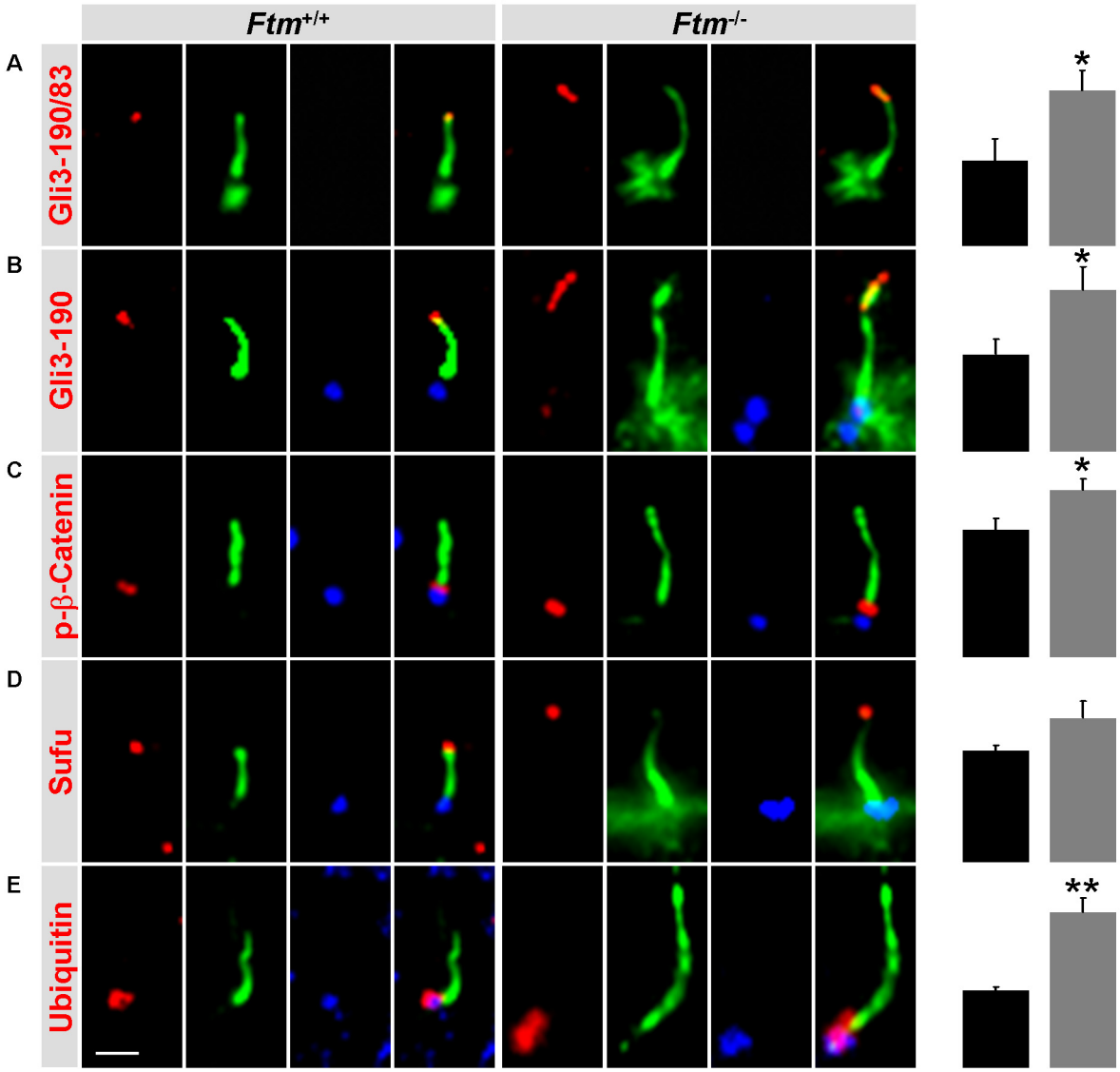

Abbildung 3.10: *Ftm*-defiziente MEFs zeigen einen Prozessierungs- und Degradierungsdefekt auf.

(A-E) Immunofluoreszenz auf MEFs aus wildtypischen und *Ftm*-negativen E12.5-Embryonen (für beide Genotypen gilt: Gli3-190/83, p-β-Catenin, Sufu: n = 5; Gli3-190: n = 6; Ubiquitin: n = 4). Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Das ziliäre Axonem wurde durch acetyliertes α-Tubulin in grün markiert. Der Basalkörper wurde durch γ-Tubulin in grün (A) oder in blau (B-E) angefärbt. Alle gemessenen Proteine sind in rot dargestellt und ihre relative Fluoreszenzintensität ist in den Säulendiagrammen illustriert. (A, B) Der Verlust von Ftm resultiert in einer signifikanten Anreicherung von Gli3-190 im ziliären Axonem (Gli3-190/83: p = 0,04479959; Gli3-190: p = 0,02422116). (C) Die p-β-Catenin-Proteinmenge ist in der $Ftm^{-/-}$-TZ signifikant erhöht (p = 0,03405003). (D) Eine tendentielle Erhöhung der ziliären Sufu-Proteinmenge kann in *Ftm*-defizienten MEFs erfasst werden (p = 0,10624103). (E) Mit einem Antikörper gegen Ubiquitin können sowohl freies Ubiquitin als auch ubiquitinierte Proteine in

Zellen detektiert werden. An der Basis *Ftm*-homozygot mutanter MEF-Zilien kann eine signifikant erhöhte Menge an Ubiquitin aufgezeigt werden (p = 0,00164066).

Eine interessante Beobachtung ist, dass sich die phosphorylierte Form des β-Catenins, die in Publikationen als Basalkörper-assoziiert beschrieben wurde (Corbit *et al.*, 2008), nun als TZ-Protein in MEFs präsentiert. Weiterhin konnten durch die hochauflösende SIM-Technologie Mikroskopaufnahmen generiert werden, die bestätigen, dass sich das p-β-Catenin in einer Ringstruktur um das Ftm-Protein herum anlagert (Abbildung 3.11 A-C).

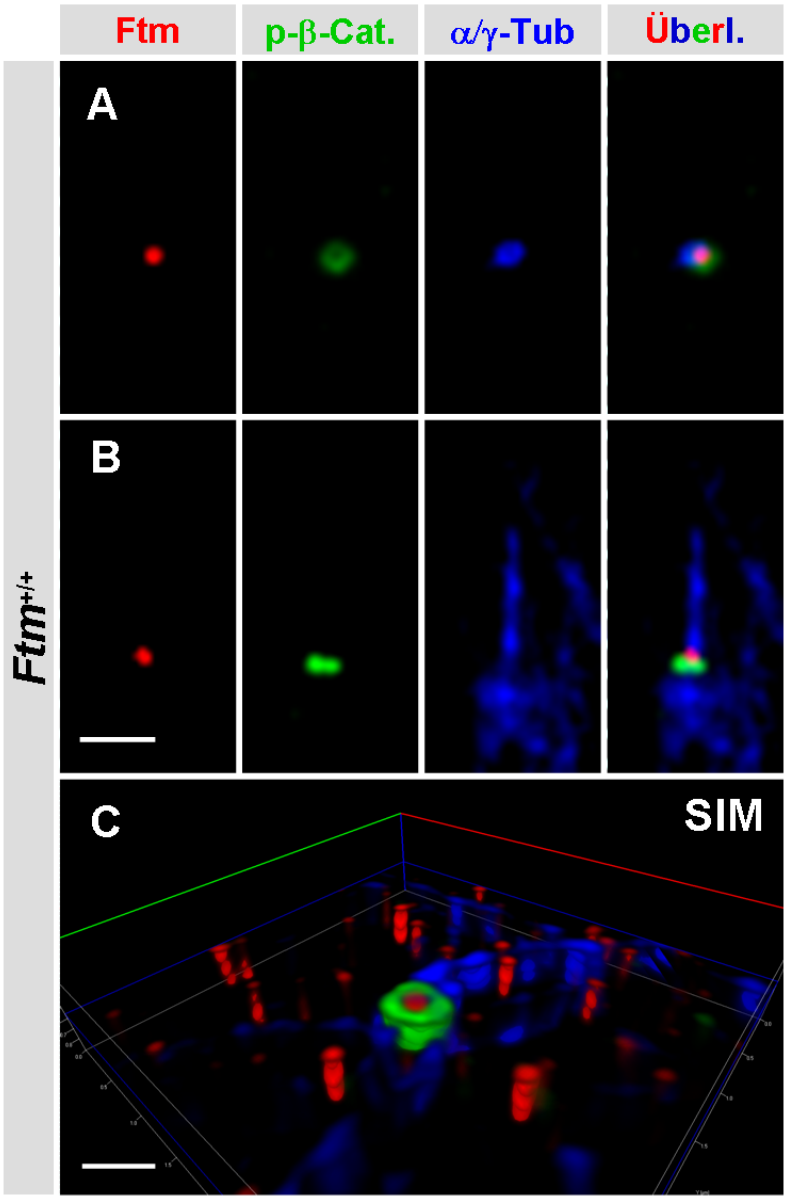

Abbildung 3.11: p-β-Catenin ist ringförmig in der TZ von MEFs lokalisiert.
(A-C) Immunofluoreszenz auf MEFs isoliert aus E12.5-Embryonen. (A, C) Der Basalkörper ist durch γ-Tubulin in blau angefärbt. (B) Das ziliäre Axonem ist durch acetyliertes α-Tubulin und der

Basalkörper durch γ-Tubulin jeweils in blau markiert. (A, B) Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. (C) Der Maßstabsbalken (in weiß) beschreibt eine Länge von 500 nm. Eine höhere Auflösung wurde durch die SIM-Technologie erzielt. p-β-Catenin kann als Ringstruktur am Zentrosom (A, C) und in der TZ (B) von Zilien detektiert werden. Ftm (rote Färbung) ist von der Ringstruktur von p-β-Catenin sowohl am Zentrosom (A, C) als auch am Basalkörper umgeben.

3.9 Parallelen zwischen proteasominhibierten Zellen und *Ftm*$^{-/-}$-MEFs

Wenn der Verlust von Ftm tatsächlich eine verminderte Proteasomaktivität zur Folge hat, würde man erwarten, dass eine Proteasominhibierung zu ähnlichen Defekten führt, wie sie in *Ftm*-defizienten Zellen detektiert werden können. Um diese Hypothese zu testen, wurden wildtypische MEFs mit MG132, einem potenten Proteasominhibitor, behandelt und auf charakteristische Veränderungen hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine signifikant erhöhte Menge an p-β-Catenin an der Basis der Zilien in behandelten Zellen detektiert werden konnte (300%; Abbildung 3.12 A, B). Zusätzlich verlängern sich die Zilien von MEFs nach einer Proteasominhibierung signifikant um 128% (Abbildung 3.12 A, C). Weiterhin wird eine abnormale Zentriolenanzahl und eine Ziliogenesestörung in proteasominhibierten Zellen beschrieben, die jedoch in den hier mit MG132 behandelten Zellen nicht analysiert und bestätigt wurde (Duensing *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2010). Alle durch eine Proteasominhibierung hervorgerufenen Veränderungen haben gemeinsam, dass sie auch in *Ftm*$^{-/-}$-MEFs detektiert werden können.

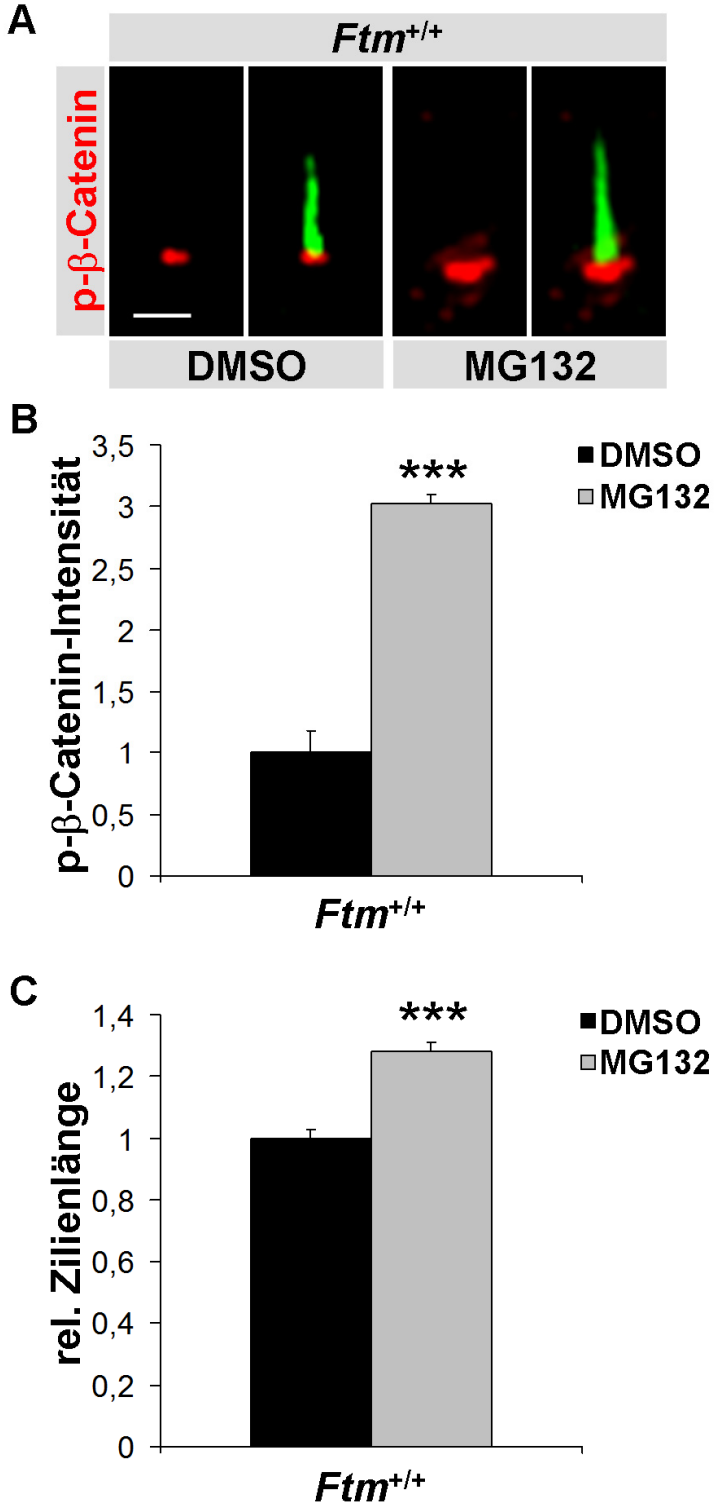

Abbildung 3.12: Die Inhibierung von Proteasomen hat eine Erhöhung der Proteinmenge von p-β-Catenin und eine Zilienverlängerung zur Folge.

(A) Immunofluoreszenz auf MEFs isoliert aus wildtypischen E12.5-Embryonen (n = 4). Die Zellen wurden mit dem Proteasominhibitor MG132 oder mit DMSO (Kontrolle) behandelt. Das ziliäre Axonem ist durch acetyliertes α-Tubulin in grün markiert. Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. (A, B) Die p-β-Catenin-Proteinmenge (rote Färbung) ist im

Vergleich zur Kontrolle an der Basis MG132-behandelter MEFs signifikant erhöht (p = 0,00051754). (A, C) Nach einer MG132-Behandlung kann eine signifikante Verlängerung der MEF-Zilien detektiert werden (p = 0,00043898).

In der Literatur wurde weiterhin berichtet, dass die Inhibierung von Proteasomen zu einer Akkumulierung von Proteasomuntereinheiten am Zentrosom führt (Didier *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2003). Deshalb wurde die Proteinmenge unterschiedlicher Proteasomuntereinheiten in wildtypischen und *Ftm*-homozygot mutanten MEFs bestimmt. Psmd2 und Psmd3 sind Komponenten der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms. Während sich die Lokalisierung von Psmd3 auf den Basalkörper wildtypischer Zilien beschränkt, kann Psmd2 sowohl am Basalkörper als auch partiell in der TZ detektiert werden (Abbildung 3.13 A, B). Psma5, ein Protein aus der 20S-Untereinheit des Proteasoms, konnte nicht nur am Basalkörper und in der TZ sondern ebenfalls im Axonem der Zilien ausgemacht werden (Abbildung 3.13 C). Diese Beobachtungen der unterschiedlichen Verteilungen von Proteasomuntereinheiten sind bemerkenswert, denn bislang beschrieben Studien das Vorkommen von Proteasomen ausschließlich am Basalkörper von Zilien (Gerdes *et al.*, 2007). Um zu bestätigen, dass Psma5 tatsächlich auch im Axonem von Zilien zufinden ist, wurden erneut ergänzende Analysen mit der hochauflösenden SIM-Technologie durchgeführt (Abbildung 3.13 D). In der Tat konnte die axonemale Verteilung von Psma5 verifiziert werden. Die weiteren Untersuchungen der Immunofluoreszenzintensitäten aller Proteasomuntereinheiten offenbarten, dass es zu einer Akkumulierung aller Komponenten an der Basis *Ftm*-defizienter Zilien kommt (Psmd2: 128%, Psmd3: 128%, Psma5: 145%). Zusammengefasst deuten die zahlreichen Parallelen zwischen proteasominhibierten Zellen und *Ftm*-defizienten MEFs auf einen gemeinsamen Defekt hin.

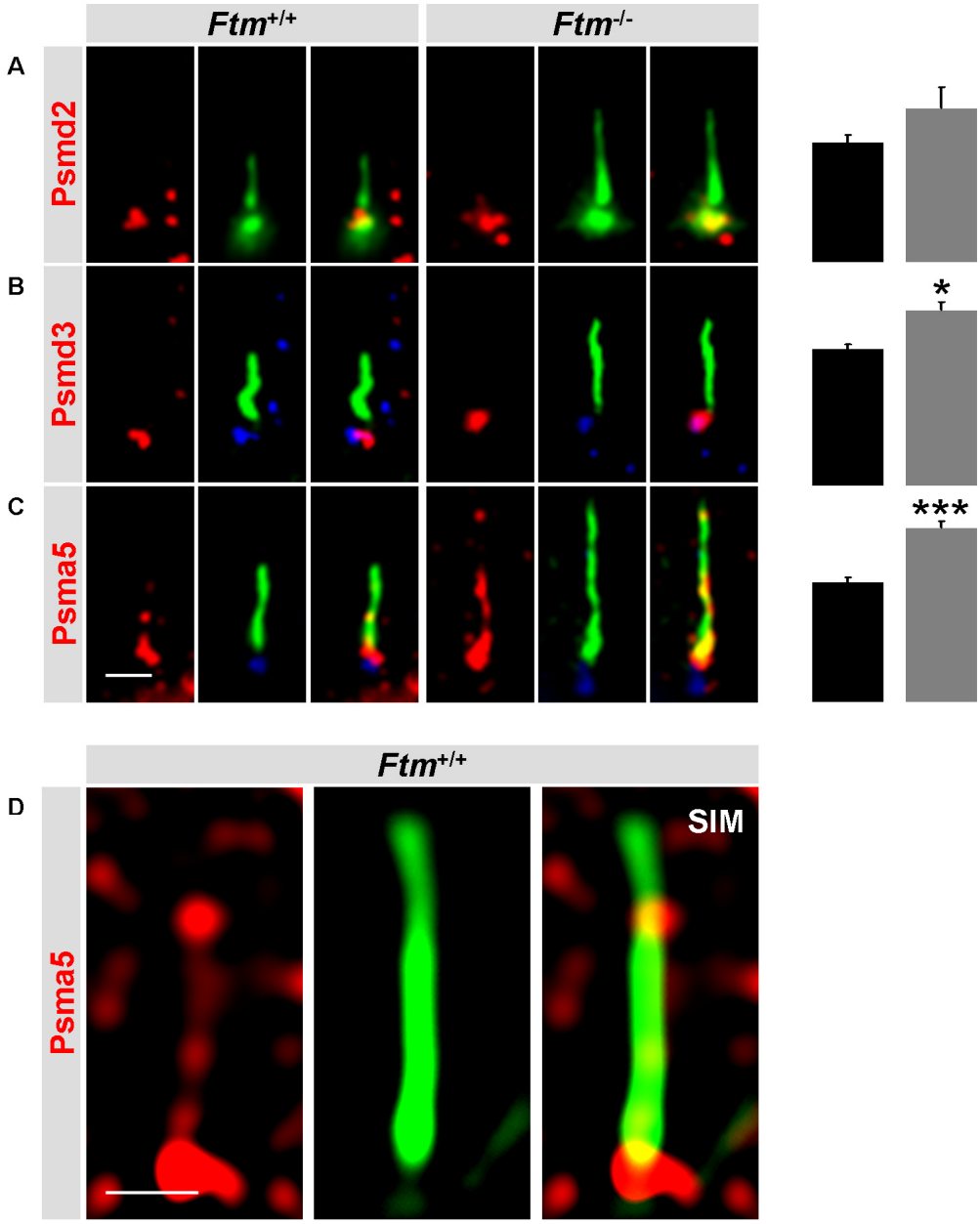

Abbildung 3.13: Akkumulierung von Komponenten proteasomaler Untereinheiten an der Basis von *Ftm*-defizienten Zilien.

(A-D) Immunofluoreszenz auf MEFs aus wildtypischen und *Ftm*-negativen E12.5-Embryonen (für beide Genotypen gilt: Psmd2, Psma5: n = 5; Psmd3: n = 3). Das ziliäre Axonem wurde durch acetyliertes α-Tubulin in grün markiert. Der Basalkörper wurde durch γ-Tubulin in grün (A) oder in blau (B, C) angefärbt. (A-C) Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 1 µm. Alle gemessenen Proteine sind in rot dargestellt und ihre relative Fluoreszenzintensität ist in den Säulendiagrammen illustriert. (D) Der Maßstabsbalken beschreibt eine Länge von 500 nm. Eine höhere Auflösung wurde durch die SIM-Technologie erzielt. (A) Die Proteinmenge von Psmd2, einer Komponente der proteasomalen 19S-Untereinheit, ist an der Basis von *Ftm*$^{-/-}$-Zilien tendentiell erhöht (p = 0,16273628). (B) Der Verlust von Ftm führt zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinmenge von Psmd3 am Basalkörper (p = 0,01301389). (C, D) Psma5, eine

Komponente der proteasomalen 20S-Untereinheit, ist am Basalkörper, in der TZ und im Axonem von Zilien lokalisiert. Die Proteinmenge von Psma5 ist in der *Ftm*-homozygot mutanten TZ signifikant erhöht (p = 7,7632E-05).

4 DISKUSSION

4.1 Die TZ-Verankerung von Ftm wird durch CC-Domänen realisiert

Viele menschliche Krankheiten werden durch funktionelle Störungen oder gänzliche Abwesenheit von TZ-Proteinen hervorgerufen. Mittlerweile sind Mutationen in mindestens zwanzig für TZ-Proteine kodierende Gene bekannt, die mit Ziliopathien in Verbindung gebracht werden (Czarnecki und Shah, 2012). Doch die molekularen Mechanismen und Interaktionen, in die TZ-Proteine involviert sind, sind noch weitestgehend unerforscht. Viele Zilien-assoziierte Proteine weisen spezies- und gewebeabhängig ein unterschiedliches Lokalisierungsmuster auf. Dieselben Proteine können sowohl am Basalkörper als auch in der TZ oder im Axonem zu finden sein (z.B. Rpgr (Hong *et al.*, 2003; Khanna *et al.*, 2005; Mavlyutov *et al.*, 2002)). Da jedes Zilienkompartiment eine eigene Funktion hat, ist es schwer zu erklären, wie dieselben ziliären Proteine in den unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten funktionieren. Gleichzeitig konnte belegt werden, dass ziliäre Proteine nicht nur in ihren Lokalisierungsmustern variieren, auch die damit verbundenen Proteininteraktionen können wechseln. Es wird beispielsweise vermutet, dass es grundlegende Unterschiede in den Interaktionen zwischen TZ-Proteinen in polarisierten Zellen wie IMCD3- oder MDCK-Zellen und Fibroblasten gibt (Sang *et al.*, 2011). Um also die Funktionen eines ziliären Proteins in bestimmten Zellen zu verstehen, muss man zunächst sein subziliäres Verteilungsmuster analysieren. Als die Untersuchungen dieser Dissertation begannen, war für Ftm lediglich eine Basalkörper-assoziierte Lokalisierung bekannt (Vierkotten *et al.*, 2007). Die detaillierte Analyse der Ftm-Lokalisierung in MEFs illustriert, dass es sich um ein Protein der TZ handelt (Abbildung 3.1 A, B). Spätere Publikationen konnten aufzeigen, dass Ftm auch im Gewebe in der TZ lokalisiert (Besse *et al.*, 2011; Coene *et al.*, 2011; Mahuzier *et al.*, 2012). Somit eignen sich die hier verwendeten MEFs bestens, um auch Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation zu erlauben.

Des Weiteren ist von Interesse, welche distinkten Ftm-Domänen für die TZ-Lokalisierung des Proteins verantwortlich sind. Die Transfektion unterschiedlicher Ftm-Proteinfragmente ergab, dass lediglich die CC1-5-Domänen für die Verankerung des Proteins am Zentrosom in wildtypischen MEFs notwendig sind (Abbildung 3.1 C). Dass sich die CC-Domänen am Zentrosom anlagern, in denen bereits das endogene Ftm-Protein vorzufinden ist, verdeutlicht, dass es noch genügend freie Bindungsstellen geben muss, um das Proteinfragment dort zu verankern. Weiterhin kann spekuliert werden, dass Ftm durch die

CC-Domänen in der Lage ist, nicht nur am Zentrosom, sondern auch in der TZ von Zilien zu lokalisieren. CC-Domänen werden für Protein-Protein-Interaktionen, speziell mit anderen CC-Domänen-enthaltenden Proteinen, benötigt (Taschner *et al.*, 2012). Auch viele andere ziliäre Proteine enthalten CC-Domänen, durch die sie zur Zilie rekrutiert werden. Nphp3, beispielsweise, hat eine potentielle CLS in seinen N-terminalen CC-Domänen, mittels dessen es am Basalkörper lokalisiert (Nakata *et al.*, 2012).

Weiterführende Analysen zur TZ-Lokalisierung verschiedener Ftm-CC-Fragmente lassen vermuten, dass wahrscheinlich die vierte CC-Domäne für die TZ-Verankerung von Ftm essentiell ist. Jene Protein-Fragmente, denen die N-terminalen ersten vier CC-Domänen fehlen, sind nicht in der Lage am Zentrosom/Basalkörper zu lokalisieren (Lin, 2009), während N-terminal drei fehlende CC-Domänen die Verankerung am Zentrosom/Basalkörper ermöglichen (Patzke *et al.*, 2010). Auch enthält die vierte CC-Domäne des Ftm-Proteins eine NLS (Lin, 2009). Unter dem Aspekt, dass Parallelen zwischen dem Nuklear-Poren-Komplex und der TZ von Zilien existieren, könnte die NLS auch eine CLS in Ftm darstellen. Außerdem enthalten auch andere ziliäre Proteine eine NLS, die sie befähigt, in der Zilie zu lokalisieren, beispielsweise der Kinesin-2-Motor Kif17 oder das Rp2-Protein (Dishinger *et al.*, 2010; Hurd *et al.*, 2011).

4.2 Ftm vermittelt die TZ-Lokalisierung der Nphp-Module

Neuste Studien zeigen, dass Ftm die Lokalisierung aller vier Multiproteinkomplexe (Nphp1-4-8-Modul, Nphp5-6-Modul, Inversin-Kompartiment und das Mks/B9-Modul) in der TZ von *C. elegans*-Zilien beeinflusst (Williams *et al.*, 2011). Um zu klären, ob Ftm auch in Säugetierzilien an der Spitze der TZ-Hierarchie agiert, wurden die Proteinmengen verschiedener Modul-Komponenten in der TZ *Ftm*-defizienter MEFs untersucht. Es stellte sich heraus, dass die beiden Komplexpartner Nphp1 und Nphp4 in Abwesenheit von Ftm vermindert in der TZ lokalisieren. Da nur noch 18% der Nphp1- und 21% der Nphp4-Proteinmengen detektiert werden können (Abbildung 3.2 A, B), ist Ftm für die quantitative Lokalisierung beider Komponenten essentiell. Dies steht somit im Einklang mit den Analysen in *C. elegans*, in denen Ftm auch für die TZ-Lokalisierung von Nphp1 und Nphp4 benötigt wird. Ferner ist bekannt, dass das humane Nphp4 für die ziliäre Lokalisierung von Nphp1 in der TZ verantwortlich ist, hingegen die TZ-Lokalisierung von Nphp4 unabhängig von Nphp1 zu sein scheint (Winkelbauer *et al.*, 2005). Auch findet wahrscheinlich keine direkte Interaktion zwischen Ftm und Nphp1 statt (Sang *et al.*, 2011). Fasst man alle Beobachtungen zusammen, ergibt sich die Vermutung, dass Ftm zunächst

Nphp4 rekrutiert und dass dieses wiederum Nphp1 verankert. Ftm steht somit an der Spitze der Hierarchie in seinem eigenen Komplex (Abbildung 4.1 A). Da noch geringe Mengen von Nphp1 und Nphp4 in der *Ftm*-negativen TZ nachgewiesen werden können, muss es jedoch entweder weitere Proteine geben, die fähig sind, Nphp1 und Nphp4 in der TZ zu verankern, oder es muss einen Mechanismus geben, der den Verlust von Ftm partiell kompensieren kann. Für das Ftm-verwandte Protein Rpgrip1 wurde erst kürzlich beschrieben, dass es u.a. für die Rekrutierung von Nphp4 in Photorezeptorzilien benötigt wird (Patil *et al.*, 2012). Ohne Rpgrip1 verschiebt sich die subzelluläre Lokalisierung von Nphp4 von einer zytosolischen Fraktion in eine ER-assoziierte Membranfraktion und das Protein kann nicht mehr in der Photorezeptor-TZ detektiert werden. Da Ftm ebenso wie Rpgrip1 über seine C2-Domänen mit Nphp4 interagiert (Arts *et al.*, 2007; Roepman *et al.*, 2005), ist es denkbar, dass beide den gleichen Rekrutierungsmechanismus benutzen, um weitere Proteine in der TZ zu verankern. Variabel könnte der Verlust von Ftm oder Rpgrip1 in gegenseitigen Kompensierungsvorgängen resultieren. Für diese Hypothese spricht auch das Ergebnis, dass die Rpgrip1-Proteinmenge in $Ftm^{-/-}$-MEFs signifikant erhöht ist (135%; Abbildung 3.5 C). Allerdings beschränkt sich diese Erhöhung lediglich auf den Basalkörper, in der TZ konnte Rpgrip1 nicht detektiert werden. Um Aufschluss über eine potentielle kompensatorische Funktion von Rpgrip1 in *Ftm*-negativer Situation zu gewinnen, wäre die Analyse von $Ftm^{-/-}$;$Rpgrip1^{-/-}$-Zellen notwendig. Erwähnenswert ist auch, dass Nphp1 und Nphp4 bei einer defekten TZ-Rekrutierung beider Proteine in membranösen ER/Golgi-Vesikeln gebunden verbleiben (Liebau *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2012). Somit könnte Ftm nicht nur als potentielles Verankerungsprotein fungieren, sondern in der TZ direkt oder indirekt an der Fusionierung von Nphp1/Nphp4-assoziierten Membranvesikeln beteiligt sein.

Ob der Verlust von Nphp1 oder Nphp4 auch eine Auswirkung auf Ftm hat, muss in Säugetieren noch untersucht werden. Analysen in *C. elegans* veranschaulichen, dass Ftm dort unabhängig von beiden Proteinen in der TZ lokalisiert (Williams *et al.*, 2011). Auch sind die *Nphp1*- und *Nphp4*-Mausmutanten in ihren phänotypischen Ausprägungen deutlich milder, als der Phänotyp bei *Ftm*-Verlust, was darauf hindeutet, dass Ftm auch in Säugetieren eine höhere Position in der TZ einnimmt ((Won *et al.*, 2011) mündliche Mitteilung Sylvie Schneider-Maunoury).

Die Analyse der Cep290-Proteinmenge zeigt, dass sich eine Ftm-Defizienz auch negativ auf dieses Protein auswirkt. Nur noch 64% der ursprünglichen Cep290-Proteinmenge können in *Ftm*-homozygot mutanten MEFs detektiert werden (Abbildung 3.2 C). In

IMCD3-Zellen wird Cep290 für die Rekrutierung von Nphp5 in der TZ benötigt (Sang *et al.*, 2011). Daher lässt sich spekulieren, ob auch die Nphp5-Verankerung indirekt von Ftm abhängt (Abbildung 4.1 B). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das Nphp5-6-Modul essentiell für die TZ-Präsenz von Ftm ist. Dies wurde in Säugetieren bislang nicht untersucht. Da in *C. elegans* kein homologes Cep290-Protein existiert (Hodges *et al.*, 2010), fehlen auch derart entsprechende TZ-Befunde. Im Menschen verursachen Mutationen im *CEP290*-Gen die gleichen Ziliopathien wie ein *FTM*-Genverlust. Auch sind die Mutationen beider Proteine in das breiteste und schwerste Spektrum aller bekannten Syndrome verwickelt (MKS, JBTS, NPHP, BBS, SLS, siehe Abschnitt 1.4) (Zaghloul und Katsanis, 2009), was darauf hindeutet, dass beide Proteine vergleichbare Funktionen in den TZ-Modulen haben könnten. Studien in *Chlamydomonas* enthüllten, dass Cep290 als Strukturprotein der Y-Verbindungen fungiert, während im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführte TEM-Untersuchungen in murinen Gliedmaßen ergaben, dass *Ftm*-Defizienz die Organisation der Y-Verbindungen nur partiell stört (unpublizierte Daten, Stephan Burmühl). Ob Ftm tatsächlich eine Komponente der Y-Verbindungen darstellt oder ob der Verlust ein sekundärer Effekt ist, der aus der verminderten Cep290-Proteinmenge resultiert, muss noch geklärt werden. Die Analyse von *Cep290*$^{-/-}$-Zellen könnte aufklären, ob beide Proteine in der TZ-Hierarchie über- bzw. untereinander agieren oder ob sie nebeneinander die Integrität der TZ beeinflussen.

Auch das dritte Nphp-Modul, das Inversin-Kompartiment, zeigt sich betroffen vom Ftm-Verlust (Abbildung 4.1 B). Es stellte sich heraus, dass verglichen zur wildtypischen Situation nur noch 54% der Invs-Menge an der TZ nachgewiesen werden können (Abbildung 3.2 D). Für Invs ist ein eigenes subaxonemales Kompartiment beschrieben worden, welches sich vom Basalkörper über die TZ bis ins Axonem erstreckt (Shiba *et al.*, 2010; Shiba *et al.*, 2009). In IMCD3-Zellen konnte gezeigt werden, dass es eine variable Extension des Inversin-Kompartiments ins Axonem gibt (Sang *et al.*, 2011). In MEFs ist die Invs-Lokalisierung bislang unzureichend beschrieben worden. Wenige Analysen zeigen, dass auch dort das endogene Invs mit dem Axonem assoziiert vorliegen soll (Watanabe *et al.*, 2003). In den hier untersuchten MEFs konnte Invs lediglich in der TZ identifiziert werden. Additive Untersuchungen demonstrieren jedoch, dass der verwendete anti-Invs-Antikörper auch im Western Blot die erwartete Invs-Proteinbande detektieren kann (unpublizierte Daten, Christoph Gerhardt). Auch die hier beobachtete spezifische Anfärbung der zellulären Plasmamembran, die für Invs beschrieben wird, ist ein Hinweis

dafür, dass der verwendete Antikörper Invs spezifisch detektiert (siehe Abbildung 8.1 im Anhang) (Eley *et al.*, 2004). Inwieweit die gefundene Abweichung der Lokalisierung auf die unzureichende Spezifität des Antikörpers oder auf die Existenz verschiedener Invs-Isoformen, für die bereits differenzielle, subzelluläre Lokalisierungen publiziert wurden (Nürnberger *et al.*, 2002; Warburton-Pitt *et al.*, 2012), zurückzuführen ist, muss noch analysiert werden. Da bekannt ist, dass Invs als molekularer Anker für Nphp3 und Nphp9 im Inversin-Kompartiment fungiert (Shiba *et al.*, 2010), kann erneut die Hypothese aufgestellt werden, dass das Fehlen von Ftm neben der Invs-Menge auch die Proteinmenge beider Modul-Komponenten negativ beeinflusst (Abbildung 4.1 B). Die molekularen Auswirkungen einer Invs-Deletion werden im Gegensatz zu anderen Nphp-Proteinen nicht mit strukturellen Ziliendefekten in Verbindung gebracht. Man geht davon aus, dass Invs eine regulatorische Funktion in der Zilie ausübt und dort beispielsweise als Komponente des PCP (engl., planar cell polarity)-Signalwegs in die Degradierung von Proteinen involviert ist (Shiba *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2005).

Die Reduktion von Nphp4 sowie Cep290 in *Ftm*-homozygot mutanten Gliedmaßenzilien verdeutlicht, dass Ftm die TZ-Lokalisierung der Module nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* reguliert (Abbildung 3.3 A, B). Folglich könnten bei einem Ftm-Verlust in Gliedmaßenzilien mindestens zwei Module in ihrer Funktion betroffen sein. Inwieweit andere Komponenten auch beeinträchtigt sind und dies wiederum die Integrität und Funktion der TZ moduliert, muss in Zukunft noch detaillierter untersucht werden. Die Tatsache, dass TEM-Aufnahmen eine defekte Organisation der Y-Verbindungen in der *Ftm*-negativen TZ von Gliedmaßenzilien aufzeigen, impliziert, dass Ftm auch dort für die Organisation der TZ unentbehrlich ist (unpublizierte Daten, Stephan Burmühl).

Somit lässt sich feststellen, dass Ftm der Organisator des Nphp1-4-8-Moduls in Säugetieren ist. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass die Abwesenheit von Ftm auch zu Störungen des Nphp5-6-Moduls sowie des Inversin-Kompartiments führt (Abbildung 4.1). Daher kommt unweigerlich die Frage auf, wie Ftm Einfluss auf die beiden letztgenannten TZ-Komplexe nimmt. Zwei Möglichkeiten sind denkbar: 1. Ftm selbst dient als Verankerungsprotein für Komponenten aller drei Nphp-Module. 2. Ftm reguliert die TZ-Lokalisierung von Nphp4 und in einer Art Kettenreaktion stellt Nphp4 die TZ-Präsenz von Nphp1 sicher, welches dann wiederum benötigt wird, um die anderen Nphp-Module in der TZ zu halten. Wäre die zweite dieser Möglichkeiten Realität, so könnte man davon ausgehen, dass *Nphp4*- bzw. *Nphp1*-defiziente Mäuse einen ähnlichen Phänotyp wie *Ftm*-negative Mäuse aufweisen. Da aber die Mausphänotypen bei *Nphp1*- und auch *Nphp4*-

Verlust nur sehr mild ausfallen, favorisiert sich die erste Möglichkeit, in der Ftm der Organisator aller Nphp-Module ist. Bemerkenswerterweise reduziert die Defizienz von Ftm die TZ-Proteinmenge der Komponenten des Nphp1-4-8-Moduls stärker als die Menge der gemessenen Komponenten des Nphp5-6-Moduls bzw. Inversin-Kompartiments. Diese Daten legen nahe, dass die TZ-Lokalisierung des Nphp5-6-Moduls sowie des Inversin-Kompartiments zusätzlich durch andere Mechanismen realisiert wird.

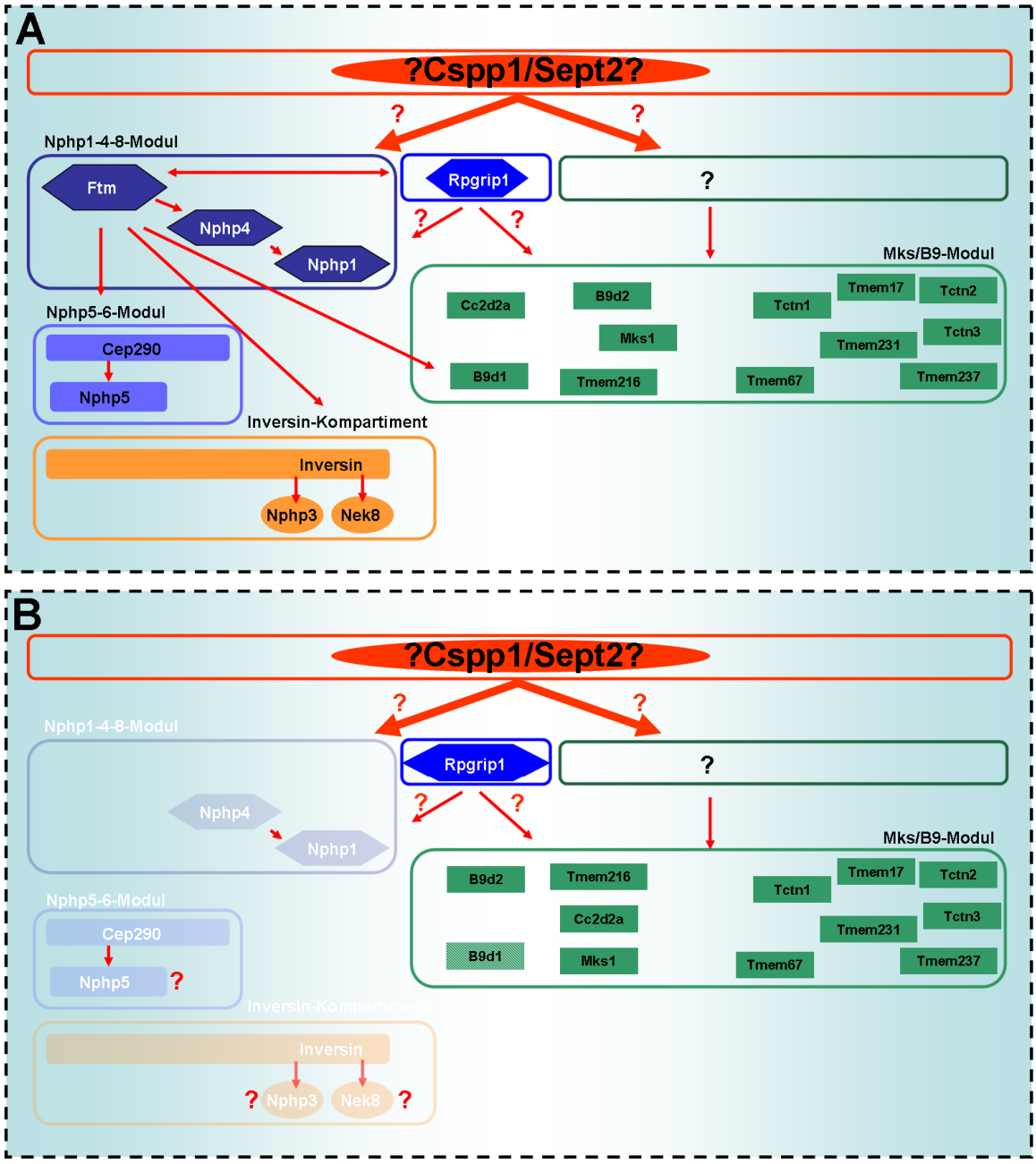

Abbildung 4.1: Modell der TZ-Assemblierungshierarchie in Säugetieren.

(A) Ftm organisiert die Zusammensetzung seines eigenen Nphp1-4-8-Moduls und ist für die TZ-Lokalisierung des Nphp5-6-Moduls und des Inversin-Kompartiments essentiell. Rpgrip1 könnte einen Teil der Nphp-Module kostabilisieren und gleichzeitig auch das Mks/B9-Modul organisieren. Das Mks/B9-Modul wird weiterhin auch über andere Proteine in der TZ verankert. Die potentiell

übergeordneten Proteine Cspp1 oder Sept2 könnten die Lokalisierung aller Module der TZ beeinflussen. (B) In der Abwesenheit von Ftm kann das Nphp1-4-8-Modul nicht mehr in der TZ lokalisieren. Gleichzeitig ist das Nphp5-6-Modul und das Inversin-Kompartiment in der TZ-Lokalisierung beeinträchtigt. Dies führt zur Störung der TZ-Integrität und die TZ kann ihre Funktion als Torwächter nicht mehr korrekt ausführen. Rpgrip1 könnte durch seine zu Ftm partiell redundanten Eigenschaften einen geringen Teil der Nphp-Module in der TZ stabilisieren. Das Mks/B9-Modul ist in Säugetieren anders als in *C. elegans* vom Ftm-Verlust größtenteils unbetroffen. Folglich wird die TZ in Säugetieren in einer höheren Komplexität organisiert. Modifiziert nach Czarnecki und Shah (Czarnecki und Shah, 2012).

4.3 Ftm ist nicht für die TZ-Lokalisierung des Mks/B9-Moduls verantwortlich

Versuche in *C. elegans* demonstrieren, dass Ftm auch dort den Hauptorganisator des Mks/B9-Moduls darstellt (Williams *et al.*, 2011). In den hier analysierten Säugetierzellen jedoch konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen den Mks/B9-Komponenten und Ftm detektiert werden. Mks1, Tmem67, Tctn1, Tcnt2 und Tctn3 benötigen Ftm nicht, um in der TZ von MEFs lokalisieren zu können (Abbildung 3.4 A, B, D-F). Lediglich B9d1 zeigt eine geringere Proteinintensität in der *Ftm*-defizienten Situation auf, die jedoch nicht signifikant modifiziert ist (Abbildung 3.4 C). Die hier gewonnenen Ergebnisse legen einen grundlegenden Unterschied zwischen der Organisation des Mks/B9-Moduls in *C. elegans* und der in Säugetieren dar (Abbildung 1.2 und 4.1 A). Inwieweit das komplette Mks/B9-Modul von Ftm unabhängig ist, bleibt fraglich und benötigt weitere Analysen. Denn, obwohl die Präsenz von B9d1 nicht signifikant verändert ist, können trotzdem nur 39% der wildtypischen Proteinmenge in der *Ftm*-defizienten TZ gemessen werden. Hinzu kommt, dass Ftm in IMCD3-Zellen benötigt wird, um Tmem237 (ein Mks/B9-Protein) in der TZ zu verankern (Huang *et al.*, 2011). Das Mks/B9-Modul ist der größte Multiproteinkomplex in der gesamten TZ (siehe Abbildung 1.2) und die TZ-Hierarchie innerhalb dieses Moduls ist in Säugetierzellen bislang noch weitestgehend unbekannt. Somit wäre es vorstellbar, dass nur die Lokalisierung von Teilkomplexen des Mks/B9-Moduls von Ftm abhängt. Eine nennenswerte Fragestellung in diesem Kontext ist, welches Protein im Mks/B9-Modul an der Spitze der TZ-Hierarchie steht und somit das Pendant zu Ftm und der Organisation der Nphp-Module darstellt. Für Tctn1 konnte bereits dargelegt werden, dass es die Lokalisierung von Tmem67 und Mks1 beeinflusst (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu, hat die Tctn1-Defizienz keinerlei Auswirkung auf die Lokalisierung der

Nphp-Module. Ergänzend ist die Tctn1-Proteinmenge in *Ftm*-defizienten Zilien unverändert. Folglich organisiert Tcnt1 das Mks/B9-Modul unabhängig von den Nphp-Modulen und könnte mit Ftm auf gleicher Stufe in der TZ-Hierarchie stehen. Weitere Kandidaten scheinen aber auch B9d1 oder Tmem231 zu sein, die ebenso die Zusammensetzung des Mks/B9-Moduls regulieren (Chih *et al.*, 2011). Auch könnte Cep290, welches in manchen Publikationen sogar zum Mks/B9-Modul gezählt wird, da es mit Cc2d2a interagiert (Gorden *et al.*, 2008), in die Stabilisierung des Komplexes involviert sein. Die 64% der Cep290-Proteinmenge in *Ftm*-negativen MEF-Zilien könnten ausreichen, um die Organisation des Mks/B9-Moduls zu regulieren. Abschließend muss in diesem Zusammenhang auch Rpgrip1 erwähnt werden, für das bereits gewebeabhängig zu Ftm redundante oder synergetische Funktionen postuliert wurden (Arts *et al.*, 2007). Rpgrip1 könnte neben Ftm die Komposition des Mks/B9-Moduls beeinflussen. Da Ftm in *C. elegans* für die Organisation aller TZ-Module essentiell ist (Williams *et al.*, 2011), kann des Weiteren spekuliert werden, dass Proteine, die ausschließlich in Säugetieren existieren und somit evolutionär jünger sind, gute Kandidaten darstellen, um sich die komplexere Organisation der TZ in Säugetieren mit Ftm zu teilen. Soweit bekannt, sind keine homologen Proteine von Cep290, Rpgrip1, Tcnt2, Tmem231 und Tmem17 in *C. elegans* existent (unpublizierte Daten Renate Dildrop) (Chih *et al.*, 2011; Hodges *et al.*, 2010). Die Generierung von Doppelmutanten oder eine RNAi-vermittelte Herunterregulierung einzelner Kandidaten im *Ftm*-negativen Hintergrund sollte in naher Zukunft die obige Fragestellung beantworten können. Resümierend kann festgestellt werden, dass Ftm in Säugetierzellen höchstwahrscheinlich nicht für die Organisation des Mks/B9-Moduls zuständig ist, was verdeutlicht, dass zwei unabhängige Multiproteinkomplexe in der Säugetier-TZ existieren.

4.4 Cspp1, Sept2 und Nukleoporine sind Kandidaten für eine Ftm-übergeordnete Position in der TZ-Assemblierungshierarchie

Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren, dass Ftm auch in Säugetierzellen eine tragende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der TZ-Integrität spielt. Nichtsdestotrotz stellt sich die Frage, ob Proteine existieren, die in der TZ-Assemblierungshierarchie eine höhere Position als Ftm ausüben. Einen nennenswerten Kandidaten stellt Cspp1 dar. Es wurde bereits gezeigt, dass Cspp1 ein Interaktionspartner von Ftm ist und dessen Lokalisierung an der ziliären Basis von hTERT-RPE1-Zellen vermittelt (Patzke *et al.*, 2010). Gleichzeitig wird Ftm nicht für die Lokalisierung von Cspp1 in der TZ benötigt

(Abbildung 3.5 A). Nennenswert ist, dass Cspp1 zwar in der TZ lokalisiert, aber, soweit bekannt, bis auf Ftm keine weiteren potentiellen Interaktionspartner in anderen TZ-Modulen aufweisen kann. Auch hat eine *CSPP1*-Depletion weitaus schwerwiegendere Defekte zur Folge als der Verlust von Ftm, da betroffene Zellen zum Teil in der S-Phase (also während der Zentriolenverdoppelung) arretieren und sich nicht mehr teilen können (Patzke *et al.*, 2005). Cspp1 ist auch in TZ-unabhängige Rekrutierungsmechanismen involviert, indem es z.B. für die Rekrutierung von MyoGEF (engl., myosin II-interacting guanine nucleotide exchange factor) zum Spindelpol verantwortlich ist (Asiedu *et al.*, 2009). Ergänzend konnte in Cspp1-Überexpressionsversuchen illustriert werden, dass Cspp1 fähig ist, zytosolisches Ftm in Vesikel-ähnlichen Ansammlungen im Zytoplasma zu rekrutieren (Lin, 2009). In diesem Zusammenhang wurde jedoch noch nicht untersucht, ob überexprimiertes Cspp1 auch zusätzliches Ftm in der TZ rekrutieren kann. Im Widerspruch steht dabei die Tatsache, dass Ftm zwar mittels seiner RID-Domäne mit Cspp1 interagiert (Vetter, 2006), dass jedoch die CC-Domänen für die TZ-Lokalisierung essentiell sind (Abbildung 3.1 C). Nichtsdestotrotz wäre es von Interesse, die Zusammensetzung der Cspp1-induzierten Ftm-Aggregationen auf potentielle Proteine zu untersuchen, die gegebenenfalls in einer Kettenreaktion direkt von Ftm rekrutiert werden könnten. Ein weiterer Aspekt, der Cspp1 zu einem potentiellen Ftm-Rekrutierungsprotein macht, ist, dass Untersuchungen eine Assoziierung von Cspp1 mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett veranschaulichen (Patzke *et al.*, 2006). Die hier gefundene Lokalisierung von Ftm innerhalb eines wahrscheinlich mit der Membran-assoziierten p-β-Catenin-Rings in der TZ von MEFs lässt vermuten, dass Ftm weniger mit der Membran als mehr mit dem Zytosol/Axonem von Zilien verbunden ist (Abbildung 3.11). Diese Vermutungen werden auch durch Immunogold-Aufnahmen von Ftm in der TZ von Photorezeptorzellen unterstützt. Dort liegt Ftm eindeutig mit dem Axonem der TZ der Photorezeptorzellen assoziiert vor (Arts *et al.*, 2007). Demnach könnte das Mikrotubuli-assoziierte Cspp1 Ftm in die Nähe des TZ-Axonems rekrutieren. Sollte Cspp1 in der TZ-Assemblierungshierarchie eine Position über Ftm einnehmen, würde sich zudem die Frage aufdrängen, ob der Verlust des Proteins die Organisation aller TZ-Modulkomplexe, also auch des Mks/B9-Moduls, betrifft. Falls dies zuträfe, ließe sich daraus ableiten, dass Cspp1 nicht nur Ftm, sondern auch dessen Pendant, den Organisator des Mks/B9-Moduls, verankert (Abbildung 4.1).

Ein weiteres Protein, welches eine Ftm-übergeordnete Funktion ausüben könnte, ist Sept2. In *Ftm*-negativen MEFs scheint die Septin-Diffusionsbarriere noch intakt zu sein, da die

Ringstruktur noch detektierbar ist. Auch kann keine Änderung in der Proteinmenge von Sept2 in der *Ftm*$^{-/-}$-TZ gemessen werden (Abbildung 3.5 B). Es wird vermutet, dass Sept2 für die Organisation des Mks/B9-Moduls zuständig ist, da Komponenten wie B9d1 oder Tmem231 Sept2 benötigen, um in der TZ lokalisieren zu können (Chih *et al.*, 2011). Ob Sept2 auch für die Organisation der Nphp-Module wichtig ist (Abbildung 4.1), bleibt eine spannende Frage. Sollte die Lokalisierung von Ftm in der TZ nicht von Sept2 abhängig sein, kann vermutet werden, dass mindestens zwei distinkte Diffusionsbarrieren in der ziliären Basis existieren. Agiert Ftm dagegen unterhalb von Sept2, würde das erklären, warum der Verlust beider Proteine eine gestörte Lokalisierung Membran-assoziierter Proteine zur Folge hat (Abbildung 3.7 A, B). Weiterhin sollen auch Nukleoporine in die Etablierung einer selektiven Diffusionsbarriere involviert sein (Dishinger *et al.*, 2010; Kee *et al.*, 2012), doch inwieweit diese mit Ftm in Verbindung gebracht werden können und ob sie im *Ftm*-defizienten Status gestört sind, muss noch analysiert werden. Erwähnenswert ist, dass bei der TAP-Aufreinigung zur Identifizierung potentieller Ftm-Interaktionspartner auch einige Importine detektiert werden konnten (siehe Tabelle 8.1 im Anhang).

4.5 Ftm kontrolliert die Proteinkomposition von Zilien in MEFs

Die Aufgabe der TZ ist es, als Torwächter den Import und Export von ziliären Proteinen zu kontrollieren bzw. zu regulieren (Omran, 2010). Bedenkt man, dass Ftm für die Organisation der meisten Module in der TZ zuständig ist, sollte geprüft werden, welche Auswirkung die Störung der TZ-Integrität zur Folge hat. Daher wurden die Proteinmengen von Membran-, BBSom- und IFT-assoziierten Komponenten in der *Ftm*-negativen Zilie untersucht. In Abbildung 3.7 A, B ist eine eindeutige Reduktion Membran-assoziierter Proteine im Axonem von *Ftm*-defizienten MEFs ersichtlich. Die Proteinmengen von sowohl Sstr3 (56%) als auch von Arl13b (45%) sind signifikant reduziert. In verschiedenen Analysen konnte dargelegt werden, dass diverse ziliäre Mechanismen in den Transport Membran-assoziierter Proteine involviert sind. Eine Störung der Diffusionsbarriere an der Zilienbasis, die dazu führt, dass beispielsweise Rezeptoren nicht mehr in der ziliären Membran aufkonzentriert werden können, ist eine mögliche Ursache (Chih *et al.*, 2011). Die detektierte, verminderte Proteinmenge von Nphp1, Nphp4, Cep290 und Invs könnte eine potentielle Diffusionsbarriere an der Basis von *Ftm*$^{-/-}$-Zilien destabilisieren. Unwahrscheinlicher hingegen ist, dass die von Septinen generierte Diffusionsbarriere in

Ftm-defizientem Zustand defekt ist, da Sept2 eine unveränderte Lokalisierung demonstriert (Abbildung 3.4 und 3.5 B).

In einem anderen Szenario könnte auch der extraziliäre Transport von Membran-assoziierten Proteinen in *Ftm*-defizienten Zilien unterbrochen sein, indem die mit Frachtproteinen gefüllten Membranvesikel nicht mehr an der ziliären Basis andocken können (Abbildung 4.2). Ein potentielles Indiz dafür sind die reduzierten Proteinmengen von Bbs5 und Rpgr in $Ftm^{-/-}$-Zilien (Abbildung 3.7 C, D). Das BBSom ist für die Fusion von Membranvesikeln mit der periziliären Membran essentiell (Nachury *et al.*, 2007). Es wandert zusammen mit den IFT-Partikeln und den Frachtproteinen in die Zilie und sorgt dort für das korrekte Recycling des IFT-Komplexes in der Zilienspitze (Wei *et al.*, 2012). Analysen demonstrieren, dass wahrscheinlich alle Bbs-Proteine benötigt werden, um den BBSom-Komplex zu stabilisieren. Zudem soll Bbs5 die Verbindung zwischen der ziliären Membran und dem BBSom generieren (Nachury *et al.*, 2007). In einigen Bbs-Mutanten konnte eine reduzierte Menge an Membran-assoziierten Proteinen nachgewiesen werden (Berbari *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2010). Durch die erniedrigte Bbs5-Proteinmenge in *Ftm*-negativen Zilien (50%) könnte also entweder der BBSom-Komplex destabilisiert sein oder die Zilienmembran-BBSom-Verbindung weist eine Beeinträchtigung auf. Fraglich bleibt jedoch, warum Bbs5 nicht im Axonem von MEFs detektiert werden kann, während es in hTERT-RPE-Zellen dort deutlich auszumachen ist (Jin *et al.*, 2010). Auch ist bereits publiziert, dass Bbs5 lediglich an der ziliären Basis von MEFs lokalisiert (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Inwieweit der Zelltyp-spezifische Unterschied in der Lokalisierung von Bbs5 eine Modifikation im BBSom-Mechanismus aufzeigt, bleibt noch zu klären. Zusätzlich kann auch eine signifikant reduzierte Rpgr-Proteinmenge (65%) in Zilien von *Ftm*-homozygot mutanten Zellen gemessen werden (Abbildung 3.7 D). Viele unterschiedliche GTPasen wie Rab8, Arl13b oder Arl6 werden für den ziliären Vesikeltransport benötigt (Hsiao *et al.*, 2012). Der GTPasen-Regulator Rpgr könnte, neben Rabin8, die Aktivität der GTPasen beeinflussen und somit den Transport Membran-assoziierter Proteine organisieren.

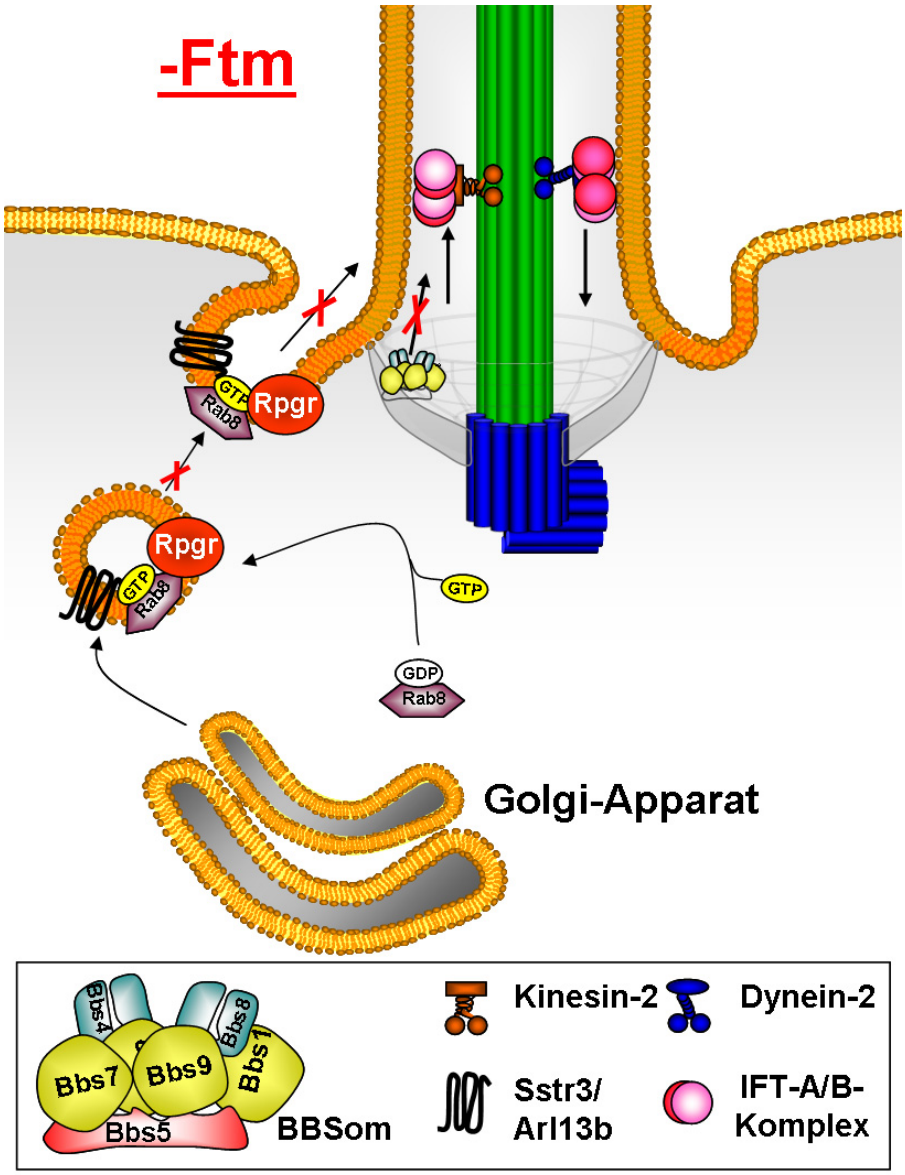

Abbildung 4.2: Modell des Transports Membran-assoziierter Proteine in *Ftm*-defizienten MEFs.

Durch den Verlust von Ftm könnte das BBSom in seiner Funktion beeinträchtig sein. Somit können mit ziliären Transmembranproteinen gefüllte Membranvesikel nicht mehr mit der periziliären Membran fusionieren. Gleichzeitig kann der GTPase-Regulator Rpgr nicht mehr die Aktivität der Rab8-GTPase regulieren. Der IFT bleibt unbetroffen.

Abschließend sollte noch erwähnt werden, dass auch der IFT in den Membran-gebundenen Transportmechanismus impliziert ist. Sowohl die Störung des IFT-A- als auch IFT-B-Komplexes werden mit einer defekten Transmembranrezeptor-Lokalisierung in Verbindung gebracht (Chih *et al.*, 2011; Liem *et al.*, 2012). Die Analyse der Ift88-Proteinmenge und Verteilung in *Ftm*$^{-/-}$-Zilien zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu wildtypischen Zilien auf (Abbildung 3.7 E und Abbildung 8.2 A im Anhang). Somit

scheint der anterograde IFT höchstwahrscheinlich auch in Zilien ohne Ftm korrekt abzulaufen. Nichtsdestotrotz könnte der anterograde IFT jedoch partiell betroffen sein, indem die Zusammensetzung des IFT-B-Komplexes oder die Transportgeschwindigkeit und Beladung mit Frachtproteinen modifiziert ist. Außerdem könnte auch der retrograde IFT dereguliert sein. Ein Hinweis auf einen deregulierten IFT ist, dass bereits die Deletion von Nphp1 oder Nphp4 mit einem defekten IFT in Zusammenhang steht (Jauregui *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009). Zusammengenommen sollten weitere Analysen unternommen werden, um die Ursache der gestörten Lokalisierung Membran-assoziierter Proteine in *Ftm*-negativen Zilien aufzudecken.

Im Kontext Membran-assoziierter Proteine ist zudem auffällig, dass Arl13b nicht nur in Ftm-Abwesenheit (Abbildung 3.7 B), sondern auch bei Defizienz anderer TZ-Proteine eine signifikante Reduktion an der TZ erfährt (Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Da Arl13b schon mit der Regulation der Zilienlänge sowie der Vermittlung von Shh-Signalen in Verbindung gebracht wurde (Larkins *et al.*, 2011), besteht der Verdacht, dass der Verlust von Arl13b für bestimmte Defekte, die bei Ziliopathien zu beobachten sind, verantwortlich ist.

4.6 Ftm reguliert das ziliäre Proteasom über die Interaktion mit Psmd2

Um die primären Auswirkungen einer Ftm-Deletion aufdecken zu können, bietet es sich an, nach potentiellen Interaktionspartnern zu suchen, die der Ftm-Verlust direkt betreffen könnte. Frühere Ergebnisse einer Hefe-Zwei-Hybrid-System-Analyse demonstrieren, dass die RID-Domäne von Ftm mit Psmd2, einer Komponente der 19S-Proteasomuntereinheit, interagiert (Vetter, 2006). In der hier durchgeführten TAP-Aufreinigung zur Identifikation neuer Ftm-Komplexpartner konnte Psmd2 erneut detektiert werden (Abbildung 3.8 A). Beachtlich ist, dass ca. 72% der hier gefundenen Proteine bereits in Zilienproteom-Analysen ausfindig gemacht werden konnten, darunter auch Psmd2 (www.ciliaproteome.org).

Bereits frühe Untersuchungen der *Ftm*-Mausmutante ließen vermuten, dass das Proteasom in seiner Funktion beeinträchtigt sein könnte. Die Störung der Shh-Signalkaskade, die in *Ftm*-defizienten Zellen ermittelt wurde, konnte auf ein modifiziertes Gli3-190 zu Gli3-83-Isoformen-Verhältnis zurückgeführt werden (Gerhardt, 2010; Lier, 2008; Vierkotten *et al.*, 2007). Gli3-190 wird normalerweise durch das Proteasom zu einer kürzeren Repressorform prozessiert (Tempe *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000; Wang und Li, 2006; Zhang *et al.*, 2006). In $Ftm^{-/-}$-Embryonen, -Herzen, -Gliedmaßen und -MEFs kann eine

erhöhte Menge an Gli3-190 ausgemacht werden (Abbildung 3.9 A-D) (Gerhardt, 2010; Lier, 2008; Vierkotten *et al.*, 2007). Dabei ist die Erhöhung der Gli3-190-Proteinmenge nicht auf eine erhöhte Transkription zurückzuführen (Abbildung 3.9 E), weshalb eine beeinträchtigte Prozessierung des Gli3-Proteins vermutet werden kann. Zudem zeigen *Ftm*-homozygot mutante Herzen und MEFs zusätzlich eine erniedrigte Menge an Gli3-83 auf, was auf einen eindeutigen Prozessierungsdefekt hinweist (Abbildung 3.9 A, B) (Gerhardt, 2010). Um zu analysieren, ob Ftm über Psmd2 die Proteasomaktivität beeinflussen könnte, wurde zunächst die Interaktion beider Proteine verifiziert. Eine weitere TAP-Aufreinigung demonstriert, dass die RID-Domäne spezifisch an Psmd2 bindet, nicht jedoch an die Negativkontrolle Gatad1 (Abbildung 3.8 B). Auch die Koimmunopräzipitation verdeutlicht, dass beide Proteine in der Lage sind, sich gegenseitig zu präzipitieren (Abbildung 3.8 C). Die Analyse der Lokalisierung von Psmd2 und Ftm ergab, dass Psmd2 hauptsächlich am Basalkörper von Zilien ausfindig gemacht werden kann, dass das Protein aber auch zusätzlich in der TZ, überlappend mit dem Ftm-Signal detektiert wird (Abbildung 3.8 D). Die Beobachtung, dass zwei Proteine nicht vollständig kolokalisieren, jedoch miteinander interagieren, wurde bereits für andere ziliäre Protein-Interaktionen beschrieben (Rachel *et al.*, 2012).

Da die Lokalisierungsanalysen von Ftm und Psmd2 zeigen, dass beide Proteine an der ziliären Basis zu interagieren scheinen (Abbildung 3.8 D), lag die Vermutung nahe, dass dort lokalisierte ziliäre Proteasomen in ihrer Aktivität beeinträchtigt sein könnten. Zusätzlich ist bekannt, dass Gli3-190 durch das Proteasom wahrscheinlich an der Basis von Zilien proteolytisch prozessiert wird (Abbildung 4.3 A) (Hui und Angers, 2011; Tuson *et al.*, 2011). Somit war es von Interesse zu analysieren, ob die zusätzliche Gli3-190-Proteinmenge auch direkt an der Zilie ausgemacht werden kann. Abbildung 3.10 A, B demonstriert, dass eine signifikant erhöhte Gli3-Proteinmenge in der Spitze *Ftm*-defizienter Zilien detektiert wird. Die gemessene Proteinzunahme kann sowohl mit einem Antikörper gegen beide Gli3-Isoformen (182%) als auch nur gegen Gli3-190 (166%) illustriert werden, was verdeutlicht, dass es sich hauptsächlich um die Volllängenform handelt. Weiterhin ist eine Erhöhung der Proteinmenge von Sufu, dem Komplexpartner und Stabilisator von Gli3, in *Ftm*-negativen Zilien von MEFs (129%) und Gliedmaßenzellen (136%) gemessen worden (Abbildung 3.9 F,G und 3.10 D). Sufu sollte normalerweise nach seiner Komplexbildung mit Gli3 auch vom Proteasom degradiert werden (Yue *et al.*, 2009). Um zu prüfen, ob sich nicht nur Shh-Signalweg-abhängige Proteine in $Ftm^{-/-}$-Zilien anreichern, wurden die Proteinmengen verschiedener potentieller

Proteasomsubstrate wie dem p-β-Catenin, oder ubiquitinierter Proteine direkt an der Basis von Zilien gemessen (Abbildung 3.10 C, E). Der hier verwendete Antikörper detektiert speziell die Phosphorylierungen des Serin 33, 37 oder Threonin 41 von β-Catenin, die für die proteasomale Degradierung des Proteins sorgen (Verheyen und Gottardi, 2010; Yost *et al.*, 1996). Auch wurde ein Antikörper gegen Ubiquitin verwendet, der nicht nur freies Ubiquitin, sondern auch polyubiquitinierte Proteine detektieren kann. Proteine mit Polyubiquitinketten sind potentielle Substrate, die von Proteasomen erkannt und degradiert werden. Die Analyse der Proteinmengen von p-β-Catenin und Ubiquitin in *Ftm*$^{-/-}$-Zilien ergab, dass es jeweils zu einer signifikanten Anreicherung an der ziliären Basis kommt (p-β-Catenin: 131%, Ubiquitin: 200%). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Prozessierung bzw. Degradierung von Proteasomsubstraten in *Ftm*-defizienten Zellen tatsächlich beeinträchtigt sein könnte (Abbildung 4.3 B).

Eine zusätzliche Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, dass p-β-Catenin als eine Ringstruktur in der TZ wahrgenommen werden kann (Abbildung 3.11). Schon frühere Publikationen verweisen darauf, dass das p-β-Catenin im Gegensatz zur unphosphorylierten Form mit den distalen Fibrillen der Mutterzentriole assoziiert zu sein scheint (Huang *et al.*, 2007). Somit lässt sich die hier gesehene Ringstruktur darauf zurückführen, dass p-β-Catenin, wahrscheinlich mit der periziliären Membran-assoziiert, an den Spitzen der Transitionsfibrillen sitzt. Cep164, Tmem231, Rp2 oder Septine sind Beispiele für ziliäre Proteine, die dort lokalisieren und auch als Ringstruktur detektiert werden können (Blacque *et al.*, 2005; Chih *et al.*, 2011; Graser *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010). In Zukunft sollte geklärt werden, ob distale Transitionsfibrillen neben dem Basalkörper auch als potentieller Ort für die Degradierung von Proteinen wie p-β-Catenin oder Gli3 ausgemacht werden können. Untersuchungen konnten demonstrieren, dass an den Spitzen der Transitionsfibrillen IFT-Partikel angereichert werden, um dort den Transport ziliärer Proteine zu regulieren (Deane *et al.*, 2001). Es wäre vorstellbar, dass potentielle Proteasomsubstrate wie Gli3 über den IFT in die Zilie transportiert werden. Aufgrund des fehlenden Shh-Liganden wird Gli3 phosphoryliert und über den retrograden IFT zurück zu den Transitionsfibrillen transportiert. Dort angekommen, könnte das markierte Protein ubiquitiniert und direkt von Proteasomen degradiert werden (Abbildung 4.3 A). Beachtlich ist, dass Gli3-190 auch vermehrt an der Basis *Ftm*-negativer Zilien detektiert werden kann (Abbildung 3.10 B). Weitere Analysen sollten unternommen werden, um zu klären, wo genau die basale Anreicherung von Gli3 detektiert werden kann.

Dies könnte beispielsweise durch Immunogoldfärbungen mit anschließender TEM-Analyse realisiert werden.

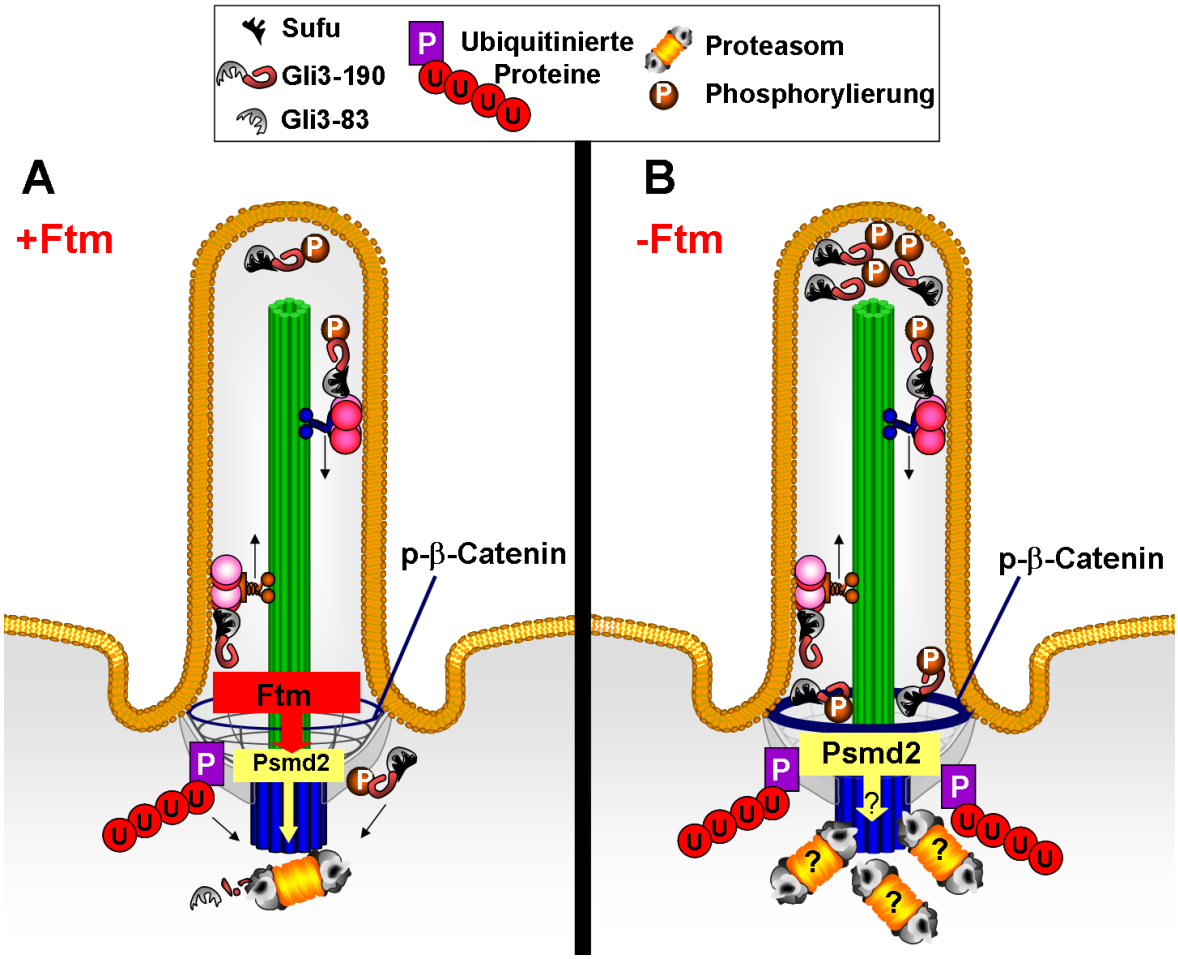

Abbildung 4.3: Die Interaktion von Ftm mit Psmd2 reguliert die Aktivität des Proteasoms.
(A) Ftm interagiert mit Psmd2, einer Komponente der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms, in der TZ von MEF-Zilien. Durch diese Interaktion wird die Aktivität des Proteasoms reguliert. Proteasomsubstrate wie p-β-Catenin, phosphoryliertes Gli3-190 oder ubiquitinierte Proteine werden degradiert oder prozessiert. Folglich werden ziliäre Signalwege kontrolliert transduziert. (B) Die Abwesenheit des Ftm-Proteins hat eine Akkumulierung potentieller Proteasomsubstrate am Basalkörper, in der TZ und in der Zilienspitze von MEFs zur Folge. Die reduzierte Aktivität der ziliären Proteasomen führt zur Rekrutierung der zytoplasmatischen Proteasommaschinerie. Ziliäre Signalwege werden nicht mehr korrekt transduziert.

4.7 *Ftm*$^{-/-}$-MEFs phänokopieren proteasominhibierte Zellen

Bei den Analysen zur TZ-Integrität *Ftm*-defizienter MEFs, wurden verschiedene Anomalien in Bezug auf die Zilienanzahl und -morphologie nachgewiesen. Zunächst können nur 19% aller *Ftm*$^{-/-}$-MEFs Zilien ausbilden (Abbildung 3.6 C). In den Zellen mit

Zilien kann eine erhöhte Anzahl an Zentriolen verzeichnet werden (126%). Zusätzlich sind *Ftm*-defiziente MEF-Zilien um 144% länger als ihre wildtypischen Pendants (Abbildung 3.6 A, B). Proportional zur Verlängerung der Zilie kann auch eine erhöhte Proteinmenge an acetyliertem α-Tubulin gemessen werden (155%). Ähnlich wie in MEFs sind die Zilien *Ftm*-homozygot mutanter Gliedmaßenzellen vergleichbar verlängert (151%) (Abbildung 3.6 A, B). Frühere Untersuchungen zeigen, dass auch eine verringerte Zilienanzahl in der Gliedmaße vorgefunden wird (Vierkotten *et al.*, 2007). Das bemerkenswerte an diesen Beobachtungen ist, dass sie alle mit einer verringerten Proteasomaktivität in Verbindung gebracht werden können. Die Behandlung von Zellen mit einem Proteasominhibitor führt wahrscheinlich aufgrund der abnormalen Mikrotubuli-Nukleation zu einer verminderten Ausbildung von Zilien, da bekannt ist, dass α- und β-Tubulin ubiquitiniert und von Proteasomen degradiert werden (Didier *et al.*, 2008; Meierhofer *et al.*, 2008; Poruchynsky *et al.*, 2008 ; Wen *et al.*, 2010). Des Weiteren kann in proteasominhibierten Zellen auch eine überzählige Zentriolenanzahl detektiert werden, die entweder auf einer abnormalen Zentriolenduplikation oder auf einer defekten Zentriolenseparierung basiert (Duensing *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2002). Das Resultat sind Zellen mit multipolaren Spindeln, die zu Fehlverteilungen des genetischen Materials führen und oft in malignen Tumoren resultieren (Pihan *et al.*, 1998). In Zukunft sollte analysiert werden, wodurch die überzähligen Zentriolen in *Ftm*-defizienten MEFs ausgelöst werden und ob sie auch zur Assemblierung multipolarer Spindeln führen. Interessant ist, dass solche Zellen normalerweise in der Mitose arretieren und sich nicht mehr weiter teilen dürfen. Die Tatsache, dass *Ftm*-defiziente MEFs trotzdem in Zellkultur gehalten werden können, spricht dafür, dass der Zellzyklus in diesen Zellen dereguliert ist. Diese Vermutung wird durch Analysen gestützt, die zeigen, dass Ftm ein Tumorsuppressorgen darstellen könnte (Lin *et al.*, 2009). In diesem Kontext ist es auch nennenswert, dass speziell die Überexpression der p-β-Catenin-Form für multiple Zentrosomen sorgt und mit einer abnormalen Mikrotubuli-Nukleation in Zusammenhang gebracht wird (Huang *et al.*, 2007). Um zu testen, ob eine Proteasominhibierung auch dazu führt, dass sich p-β-Catenin in der TZ von Zilien ansammelt, wurden wildtypische MEFs mit MG132 behandelt, einem potenten Proteasominhibitor (Lee und Goldberg, 1998). Überraschenderweise konnte nicht nur eine Anreicherung von p-β-Catenin an der Basis, sondern auch noch eine Verlängerung von Zilien detektiert werden. Beides wurde auch in *Ftm*-defizienten MEFs nachgewiesen (Abbildung 3.12). Die Verlängerung der Zilien kann ebenfalls mit dem inhibierten proteasomalen Abbau von α- und β-Tubulin erklärt werden.

In der Literatur wird weiterhin berichtet, dass die Inhibierung von Proteasomen zu einer Rekrutierung der zytosolischen proteasomalen Maschinerie zum Zentrosom führt (Didier *et al.*, 2008; Wigley *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003). Da vermutet wird, dass *Ftm*-homozygot mutante MEFs eine verminderte Proteasomaktivität aufweisen, wurde die Proteinmenge unterschiedlicher Proteasomuntereinheiten in beiden Genotypen bestimmt. Wie in Abbildung 3.13 illustriert, konnte eine signifikante Akkumulierung von Komponenten proteasomaler Untereinheiten an der Basis *Ftm*-defizienter Zilien gemessen werden. Sowohl Proteine der 20S-Untereinheit als auch Bestandteile der regulatorischen 19S-Untereinheit zeigen eine vermehrte Assoziierung mit dem Basalkörper von $Ftm^{-/-}$-Zellen auf. Auffällig ist, dass die 20S-Komponente Psma5 nicht nur an der ziliären Basis detektiert werden kann, sondern auch in der TZ und im ziliären Axonem auszumachen ist (Abbildung 3.13 C, D). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Proteasom selbst direkt über Zilien reguliert werden könnte, indem die Zusammensetzung eines aktiven Proteasoms aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten über die Zilie reguliert wird. Weiterführende Analysen könnten klären, welche Komponenten des Proteasoms noch im Axonem aufzufinden sind und ob ihr Import über TZ-Proteine reguliert wird, denn erste Untersuchungen lassen auch eine tendentiell erhöhte Axonem-Lokalisierung von Psma5 in der *Ftm*-negativen Zilie vermuten (siehe Abbildung 8.2 B im Anhang).

4.8 Ftm im Kontext des PCP-Signalwegs

Die Analysen dieser Arbeit verdeutlichen, dass Ftm die Aktivität des Proteasoms beeinflussen könnte. Aktuelle Studien zeigen, dass Ftm direkt mit Invs interagiert und diese Interaktion den PCP-Signalweg beeinflusst (Mahuzier *et al.*, 2012). Während der Aktivierung des PCP-Signalwegs binden sowohl Invs als auch Nphp4 an Dishevelled (Dvl) und sorgen für dessen proteasomale Degradierung (Burcklé *et al.*, 2011; Mahuzier *et al.*, 2012; Simons *et al.*, 2005). In MDCK-Zellen, in denen *Ftm* herunterreguliert wurde, konnte eine Reduktion der Dvl-Proteinmenge am Basalkörper aufgezeigt werden (Mahuzier *et al.*, 2012). Daher wurde postuliert, dass Ftm eine Funktion in der Inhibierung der proteasomalen Degradierung von Dvl innehaben könnte, da die Dvl-Proteinmenge am Basalkörper und im Zytoplasma bei Ftm-Verlust abnimmt (Mahuzier *et al.*, 2012). Diese Vermutung steht somit im Kontrast zu den hier gewonnen Ergebnissen, die zeigen, dass Ftm für die proteasomale Degradierung von ziliären Proteinen benötigt wird. Um diesen Widerspruch zu klären, müssten Analysen der Dvl-Proteinmenge in *Ftm*-defizienten MEFs

erfolgen. Die Ergebnisse in Abbildung 3.2 zeigen jedoch, dass Ftm für die Verankerung sowohl von Invs als auch von Nphp4 in der TZ in MEFs sorgt. Somit kann vermutet werden, dass eine verminderte Dvl-Proteinmenge, wie sie von Mahuzier *et al.* beschrieben wird (Mahuzier *et al.*, 2012), auf fehlendes Invs und Nphp4 zurückzuführen ist und nicht auf einen verstärkten proteasomalen Abbau von Dvl in Ftm-Abwesenheit. Da 46% der Invs- und 80% der Nphp4-Proteinmenge in *Ftm*-homozygot mutanten MEFs fehlen, würde man hier auch zwangsläufig erwarten, dass die Dvl-Proteinmenge an der Zilienbasis erniedrigt ist. Ohne die nötigen Proteine, wie Invs und Nphp4, die Dvl an der ziliären Basis verankern, kann sich kein Dvl anreichern. Somit kann spekuliert werden, dass die Destabilisierung von Dvl in Ftm-Abwesenheit eher eine Delokalisierung durch den Verlust der Invs und Nphp4-Proteinmenge darstellt. Allerdings wurde belegt, dass Ftm auch die totale (zytoplasmatische) Dvl-Proteinmenge stabilisiert (Mahuzier *et al.*, 2012). Daher müsste untersucht werden, wie sich die totale Dvl-Proteinmenge in *Ftm*-negativen MEFs verhält. Abschließend sollte noch angemerkt werden, dass noch immer kontrovers diskutiert wird, inwieweit Zilien und damit assoziierte Proteine überhaupt eine Rolle im PCP- oder Wnt-Signalweg spielen (Wallingford und Mitchell, 2011). Die Untersuchungen sind oftmals zweideutig und ihre Interpretation wird durch eine Vielzahl von Feedback-Mechanismen, die den Signalweg beeinflussen, noch komplizierter. Daher müssen in Zukunft noch viele Untersuchungen erfolgen, um die tatsächlichen Auswirkungen von TZ-Proteinen auf PCP-Komponenten wie Dvl zu bestimmen.

4.9 Wie könnte Ftm die proteasomale Aktivität an der Basis der Zilie regulieren?

Eine offene Frage ist, wie ein Ftm-Verlust das Proteasom in seiner Aktivität beeinflussen könnte. Um diese Frage zu klären, müsste zunächst analysiert werden, ob die beobachteten Defekte einen primären oder sekundären Ursprung haben. Beispielsweise wurde bereits für Bbs4, eine Komponente des BBSoms, publiziert, dass es die Proteasom-Aktivität positiv beeinflussen kann (Gerdes *et al.*, 2007). Geht man davon aus, dass durch die verminderte Proteinmenge von Bbs5 in *Ftm*-defizienten Zilien auch das BBSom in seiner Funktion beeinträchtigt ist, könnte dies auch indirekt für einen defekten proteasomalen Abbau in der TZ sorgen. Zudem wurde für Nphp4 eine Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Jade-1 aufgezeigt. Nphp4 stabilisiert Jade-1, welches wiederum für die Ubiquitinierung von p-β-Catenin zuständig sein soll (Borgal *et al.*, 2012). Da Nphp4 in $Ftm^{-/-}$-MEFs reduziert vorliegt, könnte diese Ubiquitinierung gestört sein. Die Tatsache, dass für einige TZ-

Proteine eine Involvierung in den UPS angenommen wird, macht deutlich, dass der Signalweg unmittelbar mit der Struktur der Zilie gekoppelt sein könnte.

Durch die Interaktion von Ftm mit Psmd2, einer Komponente der regulatorischen 19S-Proteasomuntereinheit, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass Ftm direkt in die Regulation der Proteasomaktivität involviert ist. Analysen konnten demonstrieren, dass Ftm selbst nicht über das Proteasom degradiert wird (unpublizierte Daten, Ricarda Ising). Folglich muss die Interaktion beider Proteine eher auf einer regulierenden Grundlage basieren. Proteine werden durch die 20S-Untereinheit des Proteasoms abgebaut, doch isolierte 20S-Untereinheiten, ohne eine regulatorische 19S-Untereinheit, sind nicht in der Lage eigenständig Substrate zu degradieren (Kisselev und Goldberg, 2005). Für Psmd11, ebenfalls ein Protein der regulatorischen 19S-Untereinheit, wurde bereits eine Funktion in der Assemblierung und Aktivierung von Proteasomen in humanen embryonalen Stammzellen beschrieben (Vilchez *et al.*, 2012). Psmd2 soll ebenfalls in die Regulation der Proteasomaktivität involviert sein, indem es über die Degradierung potentieller Substrate entscheidet (Elsasser *et al.*, 2002). Publikationen lassen erkennen, dass ubiquitinierte Proteine über die Ubiquitin-Rezeptoren Rad23, Dsk2 und Ddi1 rekrutiert, durch Psmd2 gebunden und dann vom Proteasom degradiert werden (Elsasser *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2011; Leggett *et al.*, 2002). Es ist vorstellbar, dass die Interaktion von Ftm und Psmd2 die Bindung dieser Faktoren beeinflusst. Ftm könnte somit über Psmd2 die Degradierung ziliärer Proteine regulieren. Ferner könnte auch ein TZ-Modul wie Nphp1-4-8 an das Proteasom binden und so die Aktivität von Proteasomen feinregulieren. Erwähnenswert ist, dass Psmd2 auch mit anderen Zentrosom-assoziierten Proteinen interagiert, z.B. Nek6 (O'Regan und Fry, 2009) oder UNC119 (Stelzl *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2011).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse eine starke Parallelität zwischen proteasominhibierten Zellen und einer Ftm-Defizienz an. Durch die Anreicherung potentieller Proteasomsubstrate und -komponenten scheint der UPS in *Ftm*-defizienten Zellen eindeutig gestört zu sein. Ftm reguliert also nicht nur die TZ-Integrität von Zilien, sondern kontrolliert durch seine Interaktion mit Psmd2 auch die proteasomale Aktivität an der Basis von Zilien (Abbildung 4.1 und 4.3).

4.10 Die *FTM*-Mutation als Ursache für Ziliopathien und Tumore

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse tragen dazu bei, die molekularen Mechanismen in Zilien und somit die Ursachen damit verbundener Ziliopathien zu

verstehen. Da Ftm sowohl in *C. elegans* als auch in der Maus für die Lokalisierung vieler TZ-Proteine essentiell ist, wird die Mutation des humanen *FTM*-Gens durch zahlreiche Symptome charakterisiert und betroffene Patienten leiden zum Teil an den schwerwiegendsten Syndromen. Die Identifikation der ziliären Hierarchiestruktur aller TZ-Module und ihrer Komponenten hilft bei der Entwicklung gezielter Therapien, die den hier beobachteten Ziliendefekten entgegenwirken könnten. Diese Arbeit verdeutlicht, dass es nicht ausreicht, die Erforschung der TZ-Struktur auf Invertebraten wie *C. elegans* zu beschränken, da gravierende Unterschiede in der Organisation der TZ aufgezeigt werden können. Während die Zilien in *C. elegans* alle in Neuronen des sensorischen Systems zu finden sind und wahrscheinlich dem gleichen Zilien-assoziierten Programm folgen, haben sich Zilien in Säugetieren mit verschiedenen Modifikationen entwickelt, die sich in der mannigfaltigen Proteinzusammensetzung des Axonems, der TZ und des Basalkörpers widerspiegeln (Czarnecki und Shah, 2012). Weiterhin ist bekannt, dass *C. elegans* auch ohne Zilien lebensfähig ist, Säugetiere jedoch bei Abwesenheit jeglicher Zilien noch in der Embryonalentwicklung sterben (Lin *et al.*, 2003). Des Weiteren sind zahlreiche TZ-Modulprotein wie Cep290, Tmem231 und Tmem17 in *C. elegans* gänzlich abwesend, während die Mutation dieser Gene im Menschen dramatische Ziliopathien auslösen können (Chih *et al.*, 2011). Diese Abweichungen zwischen den Spezies sprechen für fundamental-verschiedene Rollen, die Zilien in Invertebraten und Vertebraten spielen.

Des Weiteren werden Störungen in Zilien-assoziierten Signalwegen als Ursache vieler Tumorbildungen gesehen. Beispielsweise wird eine abnormale Aktivierung des Shh-Signalwegs in zahlreichen Krebsarten von Basalzellkarzinomen bis hin zu Brust- oder Prostata-Krebs beschrieben (Teglund und Toftgard, 2010). Dadurch, dass Zilien für die Regulation der Shh-Kaskade essentiell sind, wird der ziliären Dysfunktion eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese zugesprochen. In der Tat konnte bislang in vielen Tumorzellen von Patienten eine Reduktion der Zilienfrequenz nachgewiesen werden (Hassounah *et al.*, 2012). Gepaart mit dem Verdacht, dass Ftm ein Tumorsuppressorgen darstellt (Lin *et al.*, 2009), kann die Erforschung der ziliären Ftm-Funktion wichtige Informationen zur Bekämpfung von Krebs liefern.

5 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass Ftm eine duale Funktion ausübt, indem es die TZ-Integrität und proteasomale Aktivität an der Basis von Zilien reguliert. Einige Untersuchungen werfen jedoch neue Fragen auf, die in Zukunft durch adäquate Versuche beantwortet werden sollten.

5.1 Ist die vierte CC-Domäne für die TZ-Lokalisierung von Ftm verantwortlich?

Die durchgeführten Analysen demonstrieren, dass die CC-Domänen von Ftm für die Verankerung am Zentrosom essentiell sind (Abbildung 3.1 C). Doch es konnte nicht geklärt werden, ob das überexprimierte Proteinfragment auch in der TZ zu finden ist. Anhand einer Immunofluoreszenzfärbung gegen den Basalkörper, das Axonem und die überexprimierten CC-Domänen könnte die Lokalisierung eindeutig beschrieben werden. Weiterhin lassen zwei Untersuchungen vermuten, dass wahrscheinlich die vierte CC-Domäne für die Lokalisierung von Ftm in der TZ zuständig ist (Lin, 2009; Patzke *et al.*, 2010). Um diese Vermutung zu bestätigen, sollte ein Mutageneseversuch, in dem eine Mutation in die NLS von Ftm eingefügt wird, eine Aussage darüber erlauben, ob es sich tatsächlich um eine CLS handelt. Zudem wäre es wichtig zu analysieren, welche Ftm-Domänen für die Rekrutierung von welchen Modulen zuständig sind. Nach der Transfektion verschiedener Ftm-Konstrukte (CC-Domänen alleine oder Fusionskonstrukte aus den CC-Domänen mit jeweils der C2- oder der RID-Domäne) in einen *Ftm*-negativen Hintergrund ließe sich mit Hilfe einer Immunofluoreszenzfärbung testen, welche Modulproteine sich dann in der TZ vermehrt anlagern können. In diesem Kontext könnte eine erneute TAP-Interaktionspartnersuche helfen, die Proteine zu identifizieren, die direkt an Ftm binden. Denn es ist unbekannt, ob die Modulproteine Ftm als physiologisches Ankerprotein benötigen oder ob die Verankerung indirekt über andere Proteine oder Mechanismen abläuft. Für Nphp1 und Nphp4 wurde beschrieben, dass diese Proteine in Vesikeln gebunden verbleiben, wenn sie nicht mehr in der TZ lokalisieren (Liebau *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2012). Es wäre denkbar, dass Ftm in ähnliche Mechanismen involviert ist. Eine Fraktionierungsanalyse sollte aufdecken können, ob diese Proteine in Ftm-Abwesenheit eher Membran- oder Zytoplasma-gebunden vorliegen.

5.2 Übt Rpgrip1 eine zu Ftm redundante Funktion aus?

In *Ftm*-defizienten MEFs ist die Proteinmenge von Rpgrip1 erhöht (Abbildung 3.5 C). Für Rpgrip1 werden zu Ftm redundante Funktionen vermutet (Arts *et al.*, 2007). Ob Rpgrip1 tatsächlich einen Ftm-Verlust kompensieren kann, sollte in *Ftm*$^{-/-}$*;Rpgrip1*$^{-/-}$-Zellen untersucht werden. Per Immunofluoreszenzfärbungen könnten die Proteinmengen aller Modulproteine analysiert werden. Es wäre interessant zu erfahren, ob das Mks/B9-Modul dann immer noch in der TZ lokalisieren kann oder ob sich die Nphp1- bzw. Nphp4-Proteinmenge im Vergleich zur *Ftm*-negativen Situation verringert. Auch die Analyse des Phänotyps der *Ftm*$^{-/-}$*;Rpgrip1*$^{-/-}$-Embryonen könnte eröffnen, ob der beobachte Ftm-Phänotyp noch defektiver wird.

5.3 Welche Position bekleidet Cep290 in der TZ-Assemblierungshierarchie?

Ein Ftm-Verlust führt zu einer verminderten Lokalisierung von Cep290 und Invs in der TZ von MEFs (Abbildung 3.2 C, D). Zunächst sollte per Immunofluoreszenzfärbung analysiert werden, ob die anderen Modulpartner wie Nphp5, Nphp3 oder Nphp9 auch von der Ftm-Defizienz betroffen sind. Weiterhin wäre Cep290 auch ein guter Kandidat, der im *Ftm*-negativen Hintergrund untersucht werden sollte. Denn die Tatsache, dass eine Mutation von *CEP290* in einer ebenso großen Anzahl von verschiedenen Ziliopathiearten resultiert wie eine *FTM*-Mutation, lässt die Vermutung zu, dass beide Proteine eine vergleichbar bedeutende Rolle in der TZ von Zilien spielen. In diesem Zusammenhang ergeben sich somit folgende Fragen: Stehen Cep290 und Ftm auf einer Stufe in der TZ-Assemblierungshierarchie? Beeinflusst Cep290 die Lokalisierung der Komponenten des Nphp1-4-8-Moduls, des Inversin-Kompartiments oder des Mks/B9-Moduls? Um diese Fragen zu beantworten, sollten Immunofluoreszenzfärbungen verschiedener Modulproteine in *Cep290*$^{-/-}$ und *Cep290*$^{-/-}$*;Ftm*$^{-/-}$-defizienten Zellen bzw. in Zellen, die mit siRNA gegen *Cep290* behandelt wurden, durchgeführt werden. Eine alternative Methode wäre auch die so genannte „Deoxyribozym-Technik“. Mit Hilfe dieser kann in Primärzellen eine effizientere Gensuppression als durch den Einsatz von siRNAs erzielt werden (Grimpe, 2012).

Zudem wäre eine Ftm-Immunogoldfärbung attraktiv. Diese könnte demonstrieren, ob Ftm ein Protein der Y-Verbindungen darstellt und wenn ja, ob es die Verknüpfung zwischen dem Axonem und den Y-Verbindungen generiert. Auch eine Immunogold-Doppelfärbung

von Ftm und Cep290, die durch verschieden große Goldpartikel realisiert wird (Kee *et al.*, 2012), könnte neue Erkenntnisse erbringen.

5.4 Organisiert Ftm das Mks/B9-Modul?

Die Reduktion der Proteinmenge von B9d1 in *Ftm*-negativen Zilien ist zwar nicht signifikant, dennoch ist das Protein in seiner TZ-Lokalisierung stark beeinträchtigt (Abbildung 3.4 C). Zudem soll Ftm auch für die Lokalisierung von Tmem237 essentiell sein (Huang *et al.*, 2011). Die Analyse der Proteinmengen weiterer Mks/B9-Proteine im *Ftm*-defizienten Status sollte Klarheit darüber bringen, ob Ftm für die TZ-Lokalisierung von Teilkomponenten dieses Moduls verantwortlich ist. Zusätzlich ist es wissenswert, welches Protein das Pendant zu Ftm im Mks/B9-Modul darstellt. Tctn1, Tmem231 oder B9d1 sind gute Kandidaten, da sie die Lokalisierung anderer Mks/B9-Modulproteine beeinflussen. Die Analyse einer RNAi-vermittelten Herunterregulierung dieser Komponenten in *Ftm*-negativen Zellen sollte hier weitere Informationen über die Organisation der TZ-Hierarchie liefern.

5.5 Stehen Cspp1, Sept2 oder Nukleoporine über Ftm in der TZ-Assemblierungshierarchie?

Publizierte Analysen lassen vermuten, dass Sept2 die Lokalisierung der Mks/B9-Proteine regulieren könnte (Chih *et al.*, 2011). Auch konnte demonstriert werden, dass Cspp1 für die Lokalisierung von Ftm in hTERT-RPE1-Zellen in der TZ essentiell ist (Patzke *et al.*, 2010). Weder Sept2 noch Cspp1 weisen eine erniedrigte Proteinmenge in der TZ von $Ftm^{-/-}$-MEFs auf (Abbildung 3.5 A, B). Eine spannende Analyse wird die Untersuchung der Ftm-Proteinmenge und weiterer Modulproteine in *Sept2*- oder *Cspp1*-herunterregulierten Zellen sein. Alternativ könnte getestet werden, ob die Überexpression beider Proteine einen Einfluss auf Ftm ausübt. Erste Untersuchungen illustrieren, dass überexprimiertes Cspp1 durchaus die Fähigkeit besitzt, Ftm im Zytoplasma zu aggregieren (Lin, 2009). Doch bislang wurde noch nicht erforscht, ob per Immunofluoreszenzfärbung dann auch zusätzliches Ftm in der TZ detektiert werden kann und welche Auswirkungen dieses Szenario auf andere Modulproteine ausübt. Auch eine spektrometrische Analyse dieser beobachteten Aggregationen könnte verraten, ob das im Zytoplasma oder in der TZ angehäufte Ftm weitere TZ-Proteine direkt rekrutieren kann. Es wäre vorstellbar, dass die

Transfektion von Cspp1 ektopische TZ-ähnliche Aggregationen im Zytoplasma entstehen lässt. Ergänzend sollte auch die Funktion von Ftm in der Nukleoporin-assoziierten Diffusionsbarriere untersucht werden. Die Analyse der Lokalisierung von Nukleoporinen in der *Ftm*-negativen TZ wird erste Hinweise geben, ob eine Ftm-Defizienz die Funktion der Nukleoporin-assoziierten Diffusionsbarriere beeinflussen könnte. Weiterhin würden Lebendzell-Mikroskopie-Analysen (engl. live cell imaging) in *Ftm*-negativer Situation zeigen, ob diese Diffusionsbarriere Störungen aufweist.

5.6 Welche weiteren Folgen hat die verminderte TZ-Integrität in *Ftm*-negativen Zilien und wie könnten diese behoben werden?

Einige Folgen der verminderten TZ-Integrität in *Ftm*-homozygot mutanten Zilien konnten hier bereits dargestellt werden. Beispielsweise kann eine geschwächte Lokalisierung Membran-gebundener Proteine wie Sstr3, Arl13b oder Rpgr gemessen werden (Abbildung 3.7 A, B, D). Sstr3 gehört zur Gruppe G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren. Ergänzende Immunofluoreszenzfärbungen sollten aufzeigen, ob die Lokalisierung weiterer G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren wie Smo in *Ftm*-defizienten MEF-Zilien beeinträchtigt ist. Somit würde man erfahren, ob der Shh-Signalweg in *Ftm*-negativen Zellen zusätzlich stromaufwärts von Gli3 defektiv sein könnte.

Zudem ist auffallend, dass der Verlust der GTPase Arl13b allein diverse Auswirkungen auf die Morphologie und Funktion von Zilien hat und dass eine verminderte Arl13b-Proteinmenge in vielen Mausmutanten mit defekten oder defizienten TZ-Proteinen beschrieben wird (Dowdle *et al.*, 2011; Garcia-Gonzalo *et al.*, 2011). Die Überexpression von Arl13b in *Ftm*-negativen MEFs, bei der das Protein seine ziliäre Präsenz wiedergewinnt, wäre ein adäquater Versuch, um diejenigen Defekte zu ermitteln, die partiell oder gänzlich auf den Verlust von Arl13b zurückzuführen sind. Gelängen diese Rettungsversuche auch bei Zellen, denen andere TZ-Proteine fehlen, so wäre zu überlegen, ob Arl13b nicht einen therapeutischen Ansatzpunkt zur Heilung oder Milderung von Ziliopathien darstellen könnte.

Fortführend wäre es sinnvoll auch die Funktion des BBSoms und des IFTs in Abwesenheit von Ftm zu analysieren. Die Detektion weiterer BBSom- und IFT-assoziierter Komponenten per Immunofluoreszenzfärbung sollte aufzeigen, ob sich die Verteilung und Proteinmenge wildtypisch darstellen. Mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie könnte auch die Geschwindigkeit des Transports gemessen werden.

5.7 Wie kann bewiesen werden, dass Ftm die proteasomale Aktivität an der Basis der Zilie reguliert?

Die hier durchgeführten Analysen demonstrieren, dass Ftm mit Psmd2, einer Komponente der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms, interagiert (Abbildung 3.8). Um die Interaktion beider Proteine noch weiter zu verifizieren, sollte eine Koimmunopräzipitation mit den endogenen Proteinen erfolgen, die aufzeigen kann, dass die Proteine auch in ihrer nativen, funktionellen Konformation miteinander in Kontakt treten. Additional könnte man die Interaktion beider Partner mit Hilfe einer FRET-Analyse oder der *in situ* PLA-Technik auch direkt in der TZ darstellen. Die Studie der Proteinmengen verschiedener potentieller Proteasomsubstrate illustriert, dass diese bei Ftm-Verlust an der Basis von Zilien angehäuft werden (Abbildung 3.10). Untersuchungen sollten jedoch ausschließen, dass nicht stromaufwärts liegende Ereignisse für die Stabilisierung der Gli3-190-, Sufu- oder p-β-Catenin-Proteine verantwortlich sind. Beispielsweise wäre es möglich, dass die Hyperaktivität verschiedener Kinasen wie Gsk3β oder Pka eine vermehrte Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung bewirken. Auch sollte mit einem Antikörper gegen Monoubiquitin getestet werden, ob sich Ubiquitin selbst nicht aufgrund einer defekten Ubiquitinierung im *Ftm*-negativen Zustand anreichert. Denkbar wäre auch die Messung der ziliären Proteinmengen anderer Proteasomsubstrate wie Dvl, γ-Tubulin oder Perizentrin. Bei Dvl ist jedoch zu beachten, dass die Regulation seiner Proteinmenge auch durch andere Faktoren, wie die Anwesenheit von TZ-Ankerproteinen, beeinflusst wird.

Als Nächstes konnte quantifiziert werden, dass es zu einer Anreicherung der Proteasommaschinerie an der Basis *Ftm*-defizienter Zilien kommt (Abbildung 3.12). Fraglich ist, ob diese Proteasomen trotz ihres zytoplasmatischen und somit faktisch Ftm-unabhängigen Ursprungs, Proteine normal degradieren können. Ein Experiment, dass Klarheit bringen könnte, wäre die Aufreinigung dieser Basalkörper-assoziierten Proteasomen wie von Fabunmi *et al.* durchgeführt (Fabunmi *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang sollte getestet werden, ob die Zugabe von aufgereinigtem Ftm-Protein zu aufgereinigten Proteasomen eine verstärkte Degradierung synthetischer Substrate bewirkt (Fabunmi *et al.*, 2000).

Ergänzende Immunofluoreszenzfärbungen gegen weitere Komponenten der 19S- und 20S-Proteasomuntereinheiten sollten zusätzlich sicherstellen, dass eine funktionelle 20S-Untereinheit im Axonem von Zilien nachgewiesen werden kann. In diesem Kontext wäre es auch von Interesse, ob in einem *in vivo*-System die ziliäre Verteilung von Psma5

detektierbar ist. Die Analyse der Proteinmengen von Proteasomkomponenten, aber auch potentieller Substrate in wildtypischen bzw. *Ftm*-homozygot mutanten Gliedmaßenzilien wäre erstrebenswert.

Um zu zeigen, dass Ftm die Aktivität des Proteasoms über Psmd2 reguliert, könnte man die Expression von *Psmd2* herunterregulieren. Die sich anschließenden Quantifizierungen der Zilienlänge, verschiedener Proteasomsubstrate und Proteasomkomponenten, sowie des Gli3-Verhältnisses, würden eine Aussage darüber zulassen, ob die Beeinträchtigung von Psmd2 die in *Ftm*-defizienten MEFs beobachteten Proteasom-assoziierten Anomalien verursachen kann.

Jedoch ist der Versuch, *Psmd2* mittels siRNA herunter zu regulieren, bislang nicht erfolgreich gewesen (unpublizierte Daten, Christoph Gerhardt). Es existiert eine modifizierte HEK293T-Zelllinie, in der eine verminderte proteasomale Degradierung direkt durch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann (Gerdes *et al.*, 2007). Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung von *Ftm* oder der Einsatz der Deoxyribozym-Technik in diesen Zellen könnte einen direkten Hinweis erbringen, ob der Ftm-Verlust die Proteasomaktivität beeinträchtigt.

Im Hinblick auf die Bekämpfung der Ursachen von Ziliopathien ist es auch wissenswert, ob eine partielle Milderung der phänotypischen Auswirkungen eines Ftm-Verlustes durch Einsatz von Proteasomaktivatoren erzielt werden könnte. Die Behandlung von Zellen mit Sulforaphan, einem potenten Proteasomagonisten, könnte aufzeigen, ob beispielsweise die Anreicherung von potentiellen Proteasomsubstraten auf ein wildtypisches Niveau reduziert wird. Erfolgreiche Ergebnisse würden den Weg für neue Therapieansätze ebnen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Transitionszone (TZ) ist ein Kompartiment an der Basis von Zilien, das den Import und Export ziliärer Proteine und damit verbundener Signalwege reguliert. Vier Multiproteinkomplexe organisieren die TZ-Integrität: das Nphp1-4-8-Modul, das Nphp5-6-Modul, das Inversin-Kompartiment und das Mks/B9-Modul. Die Dysfunktion oder der Verlust dieser Modulproteine führt zu einer Vielzahl von menschlichen Ziliopathien, deren molekulare Ursachen noch ungeklärt sind. Publizierte Studien in *C. elegans* demonstrieren, dass Ftm dort den Hauptorganisator aller TZ-Module darstellt. Im Kontrast dazu ist Ftm in den hier untersuchten primären Mausfibroblasten (MEFs) zwar für die Organisation der Nphp-Module und des Inversin-Kompartiments essentiell, wird jedoch nicht für die TZ-Lokalisierung des Mks/B9-Moduls benötigt. Folglich unterliegt die Organisation der Säugetier-TZ einer höheren Komplexität. Nichtsdestotrotz enthalten *Ftm*-negative Zilien eine veränderte ziliäre Proteinkomposition: Während einige Membran-assoziierte Proteine reduziert in der Zilie lokalisieren, liegt das Ftm-verwandte, säugetierspezifische Rpgrip1 an der ziliären Basis angereichert vor. Die erhöhte Rpgrip1-Menge könnte auf eine partiell Ftm-redundante Funktion hinweisen.

Frühere Analysen demonstrieren weiterhin, dass bei Ftm-Defizienz eine Vielzahl von Signalwegen gestört zu sein scheint u.a. die Shh-Signalkaskade. Es wird vermutet, dass *Ftm*-negative Embryonen eine verminderte Proteasomaktivität aufweisen, da sich Gli3-190, welches normalerweise durch Proteasomen prozessiert wird, bei Ftm-Verlust anreichert. In dieser Arbeit wurde ebenfalls in $Ftm^{-/-}$-MEFs eine erhöhte Menge des Proteins nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass das zusätzliche Gli3 hauptsächlich in den Zilien *Ftm*-defizienter MEFs akkumuliert. Zudem wurde eine Interaktion von Ftm mit Psmd2, einer Komponente der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms, in der TZ von Zilien identifiziert. Die proteasomale Dysfunktion wurde offenkundig, als sich darstellte, dass sich die Proteinmengen verschiedener potentieller Proteasomsubstrate wie Sufu, p-β-Catenin und ubiquitinierter Proteine in der Abwesenheit von Ftm anreichern. Zusätzlich wurde eine verstärkte Rekrutierung von Proteasomkomponenten an der Basis von $Ftm^{-/-}$-Zilien ausgemacht, ein Ereignis, das in proteasominhibierten Zellen beobachtet wird. Auch verursacht die Ftm-Defizienz eine Verlängerung von Zilien und eine gesteigerte Zentriolenanzahl, ebenfalls Defekte, die auf eine Proteasomdysfunktion zurückgeführt werden können. Infolgedessen übt Ftm eine duale Funktion an der Zilie aus, indem es die TZ-Integrität und proteasomale Aktivität reguliert.

ABSTRACT

The transition zone (TZ), a compartment at the base of cilia, is suggested to regulate the import and export of ciliary proteins thereby controlling cell signaling. Four multiprotein complexes organize TZ integrity: the Nphp1-4-8 module, the Nphp5-6 module, the Inversin compartment and the Mks/B9 module. Several human ciliopathies are caused by dysfunction or loss of module proteins and little is known about their functional mechanisms. Published studies in *C. elegans* demonstrate that Ftm acts as the main organizer of TZ modules. Contrary in primary fibroblasts, Ftm is essential for organising the Nphp moduls and the Inversin compartment, but is not needed for TZ localisation of the Mks/B9 module. Consequently, there is a higher complexity in TZ organisation in mammals. Nevertheless, *Ftm*-negative cilia display a modified ciliary protein composition: Some membrane-associated proteins show reduced ciliary localisation, while localisation of the Ftm-related protein Rpgrip1 is elevated at the ciliary base. The increased Rpgrip1 level could be due to a partially Ftm-redundant function.

Furthermore, former analyses demonstrate that Ftm deficiency causes defects in several signaling pathways, especially in the Shh signaling cascade. It is assumed, that *Ftm*-negative embryos exhibit a lowered proteasome activity, since Gli3-190, which is normally processed by proteasomes, is accrued by loss of Ftm. In this work an increased level of this protein was also detected in $Ftm^{-/-}$-MEFs. Concomitantly, the additional Gli3 turns out to be mainly accumulated in cilia of *Ftm*-deficient MEFs. Moreover, the interaction of Ftm and Psmd2, a component of the proteasomal regulatory 19S subunit could be identified in the TZ of cilia. The proteasomal dysfunction was evident, when it was revealed that protein levels of several potential proteasome substrates like Sufu, p-β-Catenin and ubiquitinated proteins enrich in the absence of Ftm. Additionally, there is a strengthened recruitment of proteasomal components to the base of cilia, an event described in cells with proteasome inhibition. Ftm deficiency also causes elongation of cilia and an elevated amount of centrioles, defects, which also can be attributed to proteasomal dysfunction. Taken together, Ftm exerts a dual function at the cilium, it regulates TZ integrity and proteasomal activity.

7 ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

Abkürzungen:

abs.	absolut
Ace	Aceton
Arl13b	ADP-ribosylation factor-like 13 b
ATP	Adenosintriphosphat
autoklav.	autoklaviert
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
BMFZ	Biologisch-Medizinisches-Forschungszentrum
Bmp	Bone morphogenetic protein
bzw.	beziehungsweise
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
ca.	circa
CC	Coiled-coil
cDNA	complementary DNA
Cep290	Centrosomal protein 290kDa
Ck1	Casein kinase 1
CLS	Ciliary localization sequence
Cspp	Centrosome and spindle pole associated protein 1
d.h.	das heißt
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH_2O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DUB	Deubiquitinierendes Protein
Dvl	Dishevelled
E	Embryonaltag
ECL	Enhanced chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	*et cetera*

FCS	Fetal calf serum
Fgf	Fibroblast growth factor
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
Ft	Fused toes
Ftm	Fantom
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
Gli	Glioma-associated oncogene homolog
Gli2	Gli-Krüppel family member 2
Gli3	Gli-Krüppel family member 3
Gli3-190	Gli3-Aktivatorisoform
Gli3-83	Gli3-Repressorisoform
GPCR	G protein-coupled receptor
Gsk3β	Glycogen synthase kinase 3β
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hemagglutinin
HCl	Salzsäure
HEK293T	Human embryonic kidney
Hh	Hedgehog
HRP	Horseradish peroxidase
hTERT-RPE1	Telomerase-immortalized human retinal pigment epithelial
IFT	Intraflagellar-Transport
IMCD3	Inner medullary collecting duct
Invs	Inversin
JBTS	Joubert-Syndrom
Kif	Kinesin family member
MDCK	Madin Darby canine kidney
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MeOH	Methanol
Mks	Meckel-Gruber-Syndrom
mRNA	messenger RNA
MTOC	Microtubule organizing center
NES	Nukleare Exportsequenzen
NLS	Nukleare Lokalisierungssequenzen

NPC	Nuclear pore complex
Nphp	Nephronophthise
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCP	Planar cell polarity
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFRα	Platelet-derived growth factor receptor α
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin homology
Pka	Proteinkinase a
PLA	Proximity ligation assay
Ptc1	Patched 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RID	RPGR interacting domain
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
Rp2	Retinitis pigmentosa 2
Rpgr	Retinitis pigmentosa GTPase regulator
Rpgrip1	Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein1
Rpgrip1l	Rpgr-interacting protein 1-like protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sept2	Septin2
Shh	Sonic hedgehog
SIM	Structured Illumination Microscopy
siRNA	small interfering RNA
Smo	Smoothened
Sstr3	Somatostatinrezeptor3
Strep	Streptavidin
Sufu	Suppressor of fused
TAP	Tandem affinity purification
Taq	Thermophilus aquatus
Tctn	Tectonic
TE	Tris-EDTA-Puffer

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGFβ	Transforming growth factor β
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tmem	Transmembran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amonimethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TZ	Transition zone
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
z.B.	zum Beispiel
γ-TuRC	γ-Tubulin ring complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

Einheiten:

bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
g	Gramm
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pH	H^+-Ionenkonzentration
pmol	Pikomol

sec.	Sekunde(n)
U	Enzymeinheit (unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen auf Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht auf Volumen

8 ANHANG

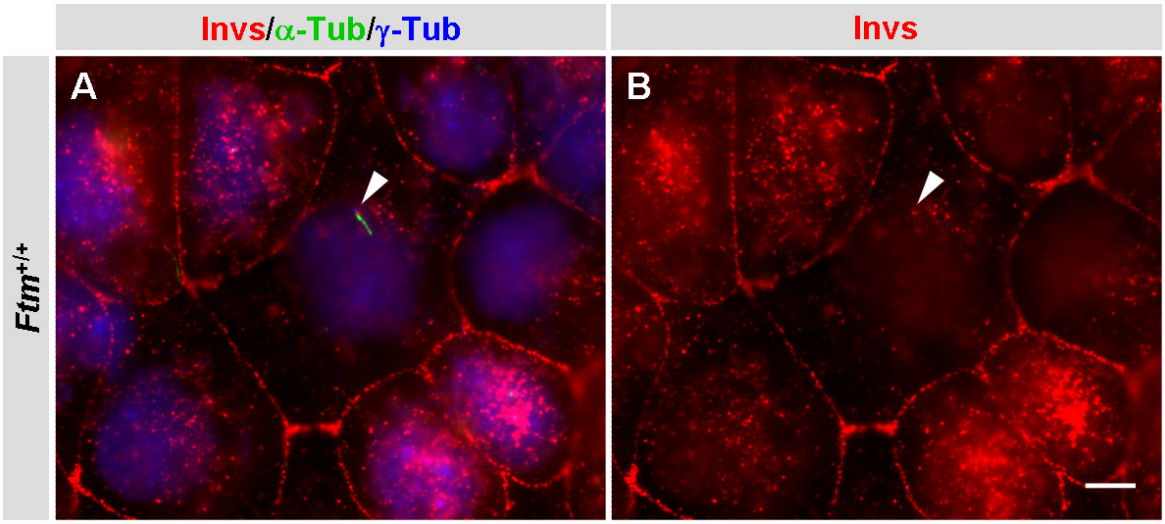

Abbildung 8.1: Invs lokalisiert in der TZ und an der Plasmamembran von IMCD3-Zellen.
(A) Immunofluoreszenz auf IMCD3-Zellen. Der Maßstabsbalken (in weiß) repräsentiert eine Länge von 5 µm. Das ziliäre Axonem ist durch acetyliertes α-Tubulin in grün und der Basalkörper durch γ-Tubulin in blau angefärbt. (A, B) Invs (rote Färbung) ist in der TZ von Zilien und an der Plasmamembran von Zellen lokalisiert.

Tabelle 8.1: Potentielle Interaktionspartner für die CC- und RID-Domänen des Ftm-Proteins.
In einer TAP-Aufreinigung wurden assoziierte Proteine der CC-Domänen (Bande 23, 24) und RID-Domäne (Bande 1-22) isoliert und mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert. Die Banden-Nr. im Silbergel (Abbildung 3.8), das offizielle Symbol, der Name, das Molekulargewicht (MW), die „Accession"-Nr., die Anzahl der gefundenen Peptide (Treffer) und die Präsenz im Zilienproteom bzw. die Detektionshäufigkeit der Proteine in verschiedenen Zilienproteom-Analysen sind angegeben.

Bande-Nr.	Offizielles Symbol	Name	MW	Accession-Nr.	Peptide (Treffer)	Zilien-Proteom
1	Cad	Carbamoyl-phosphate synthetase 2	243081,3	B2RQC6	57	1
	Myh9	Myosin-9	226230,5	Q8VDD5	16	4
	Flna	Filamin-A	281015,3	Q8BTM8	4	1
	Acaca	Acetyl-CoA carboxylase 1	265085,7	Q5SWU9	8	1
	Fer1l3	Myoferlin	233174,9	Q69ZN7	3	1
2	Ftm	Fantom	144895,5	Q8CG73	8	1
3	Novel protein	Novel protein	145926,7	A8Y5E2	69	-
	Copa	Coatomer subunit alpha	138357,8	Q8CIE6	27	6
	Cspp1	Centrosome and spindle pole associated protein 1	137345,4	B2RX88	3	-

4	Rai14	Ankycorbin	108785,1	Q9EP71	72	4
	Cand1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	136244,8	Q6ZQ38	21	1
	Jak1	Tyrosine-protein kinase JAK1	133281,6	P52332	50	2
	Myh6	Myosin-6	223425,5	Q02566	58	4
	Ipo9	Importin-9	115977,8	Q91YE6	10	-
	Atp2a2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	114783,8	O55143	5	2
	Myh1	Myosin-1	223202,4	Q5SX40	11	-
	Mtco2	Cytochrome c oxidase subunit 2	25959,0	P00405	3	-
5	Hsph1	Heat shock protein 105 kDa	96346,3	Q61699	61	4
	Nek4	Serine/threonine-protein kinase Nek4	88939,0	Q9Z1J2	27	5
	Hspa4	Heat shock 70 kDa protein 4	94073,2	Q61316	29	4
	Myo1c	Myosin-Ic	118081,9	Q9WTI7	15	1
	Ipo7	Importin-7	119409,8	Q9EPL8	12	1
6	Aldh18a1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	87242,1	Q9Z110	4	-
7	Pfkl	6-phosphofructokinase, liver type	85246,5	P12382	12	1
	Gfpt1	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	78489,3	P47856	12	-
	Abcf2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	71735,9	Q99LE6	9	2
	Eif4b	Eukaryotic translation initiation factor 4B	68799,2	Q8BGD9	6	1
	Pfkm	6-phosphofructokinase, muscle type	85214,6	P47857	7	1
	Pip5k1c	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-1 gamma	72363,4	O70161	3	-
	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	70827,3	P63017	4	4
	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	72377,6	P20029	3	4
	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	69697,9	P17156	3	4
	Abcf3	ATP-binding cassette sub-family F member 3	79815,3	Q8K268	4	2
	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	83848,3	Q8CAQ8	3	-
8	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	72377,6	P20029	180	4
	Hspa9	Stress-70 protein, mitochondrial	73482,8	P38647	97	4
	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	70827,3	P63017	24	4
	Tars2	Threonyl-tRNA synthetase, mitochondrial	81649,0	Q3UQ84	31	2

	Ctps	CTP synthase 1	66640,2	P70698	15	-
	Nsf	Vesicle-fusing ATPase	82561,1	P46460	9	3
	Lmna	Lamin-A/C	74192,8	P48678	7	1
	Zyg11b	Protein zyg-11 homolog B	83937,5	Q3UFS0	13	-
	D1Pas1	Putative ATP-dependent RNA helicase Pl10	73095,3	P16381	8	-
	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	69697,9	P17156	7	4
9	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	70827,3	P63017	244	4
	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	72377,6	P20029	15	4
	Hspa1a	Heat shock 70 kDa protein 1A	70036,1	Q61696	24	4
	Hspa9	Stress-70 protein, mitochondrial	73482,8	P38647	39	4
	Slc25a12	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	74522,9	Q8BH59	9	1
	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	69697,9	P17156	40	4
	Zyg11b	Protein zyg-11 homolog B	83937,5	Q3UFS0	15	-
10	Aifm1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	66724,0	Q9Z0X1	55	-
	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	70827,3	P63017	41	4
	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	72377,6	P20029	8	4
	Hspa1a	Heat shock 70 kDa protein 1A	70036,1	Q61696	16	4
	Wdr32	WD repeat-containing protein 32	61519,7	A2AKB9	5	-
	Ddx17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	72354,1	Q501J6	6	2
	Slc25a12	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	74522,9	Q8BH59	13	1
	Rpn1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	68485,9	Q91YQ5	18	1
	Rars	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	75625,3	Q9D0I9	23	2
	Ddx5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	69276,9	Q61656	5	2
	Slc25a13	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	74420,0	Q9QXX4	4	1
	Ehd2	EH domain-containing protein 2	61136,0	Q8BH64	3	1
	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	69697,9	P17156	6	4
11	Cct1	T-complex protein 1 subunit alpha A	60302,7	P11984	32	2

	Psmd3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	60661,4	P14685	14	1
	Cct1	T-complex protein 1 subunit alpha B	60410,8	P11983	5	2
	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	69697,9	P17156	5	4
	Toe1	Target of EGR1 protein 1	56835,1	Q9D2E2	10	-
	Map3k7ip1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7-interacting protein 1	54582,3	Q8CF89	5	-
	Rbpj	Recombining binding protein suppressor of hairless	58500,1	P31266	4	-
	Arcn1	Coatomer subunit delta	57181,3	Q5XJY5	15	1
	Hspa1a	Heat shock 70 kDa protein 1A	70036,1	Q61696	3	4
	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	70827,3	P63017	16	4
	Cct6a	T-complex protein 1 subunit zeta	57967,8	P80317	8	2
	Yars	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59068,2	Q91WQ3	11	1
	Ehd1	EH domain-containing protein 1	60564,7	Q9WVK4	4	1
12	Prpf31	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein	55367,3	Q8CCF0	14	1
	Cct1	T-complex protein 1 subunit alpha A	60302,7	P11984	5	2
		Putative uncharacterized protein	52949,7	Q8BP77	3	-
13	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain	50103,7	P68369	78	4
	Tubb6	Tubulin beta-6 chain	50058,2	Q922F4	16	4
	Tubb2c	Tubulin beta-2C chain	49799,0	P68372	26	4
	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59715,7	Q03265	36	3
	Tubb5	Tubulin beta-5 chain	49639,0	P99024	17	4
	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain	49877,5	P68373	5	4
	Impdh2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	55779,8	P24547	12	1
	Tuba1b	Tubulin alpha-1B chain	50119,6	P05213	14	4
	Tubb3	Tubulin beta-3 chain	50386,3	Q9ERD7	8	4
	Phgdh	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	56549,2	Q61753	3	1
	Il1rl1	Interleukin-1 receptor-like 1	64760,0	P14719	3	-
	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	69697,9	P17156	3	4
	Serbp1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	44687,3	Q9CY58	3	1
	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	57441,3	P80314	3	2
14	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	50082,2	P10126	45	3

	Psmc4	26S protease regulatory subunit 6B	47251,6	P54775	3	3
	Eno1	Alpha-enolase	47111,3	P17182	41	2
	Atxn10	Ataxin-10	53672,6	P28658	13	1
	Dnaja2	DnaJ homolog subfamily A member 2	45716,6	Q9QYJ0	11	4
	Dnaja1	DnaJ homolog subfamily A member 1	44839,5	P63037	6	4
	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45700,9	Q9Z2X1	3	-
	Serpinh1	Serpin H1	46560,3	P19324	6	2
	Tubg1	Tubulin gamma-1	51068,8	P83887	3	4
	Tuba1a	Tubulin alpha-1A	50103,7	P68369	3	4
15	Actb	Actin, cytoplasmic 1	41709,7	P60710	41	4
	Pelo	Protein pelota homolog	43338,0	Q80X73	17	-
	Rpsa	40S ribosomal protein SA	32817,5	P14206	7	1
	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	50082,2	P10126	5	3
	Slc25a24	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	52868,2	Q8BMD8	6	-
	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	48205,1	Q9DB77	19	-
	Sqrdl	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	50308,0	Q9R112	14	-
	Rtcd1	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	39201,3	Q9D7H3	4	1
	Actb	Putative uncharacterized protein	41772,9	Q3U804	5	4
16	Tmod3	Tropomodulin-3	39478,4	Q9JHJ0	6	1
	Anxa2	Annexin A2	38651,9	P07356	3	2
17	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35787,2	P16858	7	2
	Myl3	Myosin light chain 3	22407,3	P09542	6	3
	Acta2	Actin, aortic smooth muscle	41981,8	P62737	11	4
18	Rps3	40S ribosomal protein S3	26657,4	P62908	100	1
	Cdc2	Cell division control protein 2 homolog	34085,0	P11440	19	2
	Pno1	RNA-binding protein PNO1	27436,6	Q9CPS7	5	-
	Vdac3	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	30733,4	Q60931	7	-
	Rps2	40S ribosomal protein S2	31211,7	P25444	3	-
19	Slc25a5	ADP/ATP translocase 2	32910,2	P51881	5	-
	Srprb	Signal recognition particle receptor subunit beta	29560,7	P47758	5	1
	Slc25a11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	34132,9	Q9CR62	7	1
	Rps3	40S ribosomal protein S3	26657,4	P62908	8	1
	Slc25a3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	39606,5	Q8VEM8	3	-
	Anxa2	Annexin A2	38651,9	P07356	6	2

	Phb Slc25a1	Prohibitin Putative uncharacterized protein	29801,9 33979,9	P67778 Q3TDH6	3 4	2 -
20	Slc25a4 Dpm1 Rps3 Myl3 Slc25a5 Rps4x	ADP/ATP translocase 1 Dolichol-phosphate mannosyltransferase 40S ribosomal protein S3 Myosin light chain 3 ADP/ATP translocase 2 40S ribosomal protein S4, X isoform	32883,1 29156,5 26657,4 22407,3 32910,2 29579,1	P48962 O70152 P62908 P09542 P51881 P62702	20 4 3 3 3 3	- 1 1 3 - 1
21	Ran Rab21	GTP-binding nuclear protein Ran Putative uncharacterized protein Ras-related protein Rab-21	24407,6 26405,0 24091,2	P62827 Q9CPN9 P35282	19 4 3	3 - 3
22	Rpl9 Rpl10 Atp5f1	60S ribosomal protein L9 60S ribosomal protein L10 ATP synthase subunit b, mitochondrial	21867,8 24587,9 28930,5	P51410 Q6ZWV3 Q9CQQ7	5 3 5	- 1 3
23	Ftm Psmd2	Fantom 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	144895,5 100138,9	Q8CG73 Q8VDM4	72 3	- 1
24	Pkp1 Pof1b	Plakophilin-1 Protein POF1B	80844,5 68458,9	P97350 Q8K4L4	5 3	1 -

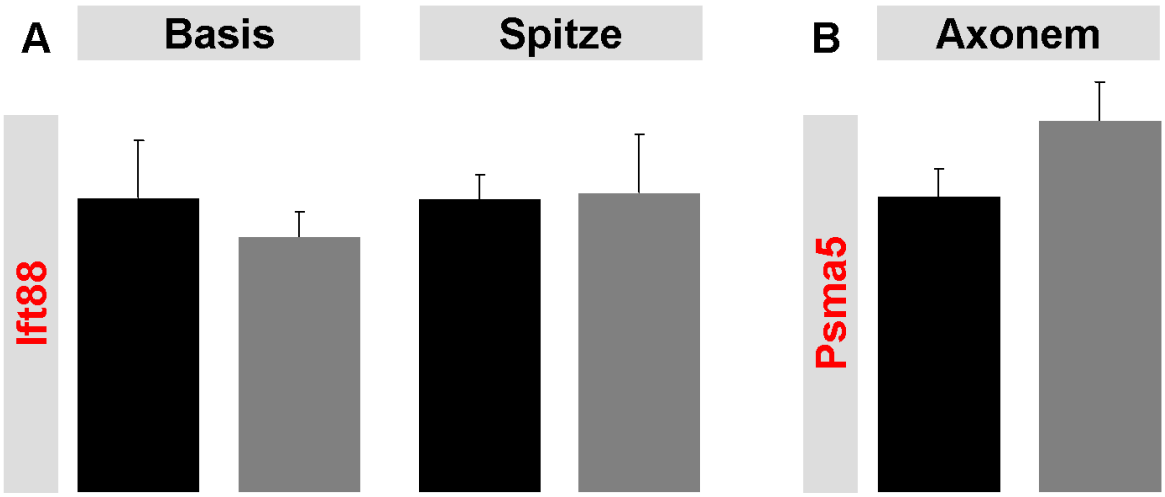

Abbildung 8.2: *Ftm*$^{-/-}$-Zilien zeigen eine wildtypische Ift88-Verteilung und eine tendenziell erhöhte axonemale Psma5-Proteinmenge auf.

(A, B) Relative Fluoreszenzintensitäten in Zilien von MEFs (E12.5-Embryonen) (für beide Genotypen: *Ftm*$^{+/+}$ (schwarz) und *Ftm*$^{-/-}$ (grau) gilt n = 5). (A) Die Proteinmenge von Ift88 ist sowohl an der Basis als auch in der Spitze von *Ftm*-negativen MEF-Zilien unverändert (Basis: p = 0,39087338; Spitze: p = 0,93179852). (B) Die Proteinmenge von Psma5 ist im Axonem von *Ftm*-defizienten Zilien tendenziell erhöht (p = 0,14596242).

9 LITERATUR

Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Doré, G., Julkowska, D., Tavenet, A., Bastin, P. (2008) Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Mol. Biol. Cell* 19, 929-944.

Afzelius, B. (1976) A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193, 317-319.

Ahmed, N., Gao, C., Lucker, B., Cole, D., Mitchell, D. (2008) ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery. *J. Cell Biol.* 183, 313-322.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004) Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH.

Anderson, R. (1972) The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *J. Cell Biol.* 54, 246-265.

Arts, H., Doherty, D., van Beersum, S., Parisi, M., Letteboer, S., Gorden, N., Peters, T., Märker, T., Voesenek, K., Kartono, A., Ozyurek, H., Farin, F., Kroes, H., Wolfrum, U., Brunner, H., Cremers, F., Glass, I., Knoers, N., Roepman, R. (2007) Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat. Genet.* 39, 882-888.

Asiedu, M., Wu, D., Matsumura, F., Wei, Q. (2009) Centrosome/spindle pole-associated protein regulates cytokinesis via promoting the recruitment of MyoGEF to the central spindle. *Mol. Biol. Cell* 20, 1428-1440.

Avidor-Reiss, T., Maer, A., Koundakjian, E., Polyanovsky, A., Keil, T., Subramaniam, S., Zuker, C. (2004) Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell* 117, 527-539.

Azzi, A., Boscoboinik, D., Hensey, C. (1992) The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 208, 547-557.

Baala, L., Audollent, S., Martinovic, J., Ozilou, C., Babron, M., Sivanandamoorthy, S., Saunier, S., Salomon, R., Gonzales, M., Rattenberry, E., Esculpavit, C., Toutain, A., Moraine, C., Parent, P., Marcorelles, P., Dauge, M., Roume, J., Le Merrer, M., Meiner, V., Meir, K., Menez, F., Beaufrère, A., Francannet, C., Tantau, J., Sinico, M., Dumez, Y., MacDonald, F., Munnich, A., Lyonnet, S., Gubler, M., Génin, E., Johnson, C., Vekemans, M., Encha-Razavi, F., Attié-Bitach, T. (2007) Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 170-179.

Bachmann-Gagescu, R., Phelps, I., Stearns, G., Link, B., Brockerhoff, S., Moens, C., Doherty, D. (2011) The ciliopathy gene cc2d2a controls zebrafish photoreceptor outer segment development through a role in Rab8-dependent vesicle trafficking. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4041-4055.

Badano, J., Mitsuma, N., Beales, P., Katsanis, N. (2006) The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7, 125-148.

Bai, C., Stephen, D., Joyner, A. (2004) All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev. Cell.* 6, 103-115.

Baker, S., Haeri, M., Yoo, P., Gospe, S., Skiba, N., Knox, B., Arshavsky, V. (2008) The outer segment serves as a default destination for the trafficking of membrane proteins in photoreceptors. *J. Cell Biol.* 183, 485-498.

Behal, R., Miller, M., Qin, H., Lucker, B., Jones, A., Cole, D. (2012) Subunit interactions and organization of the Chlamydomonas reinhardtii intraflagellar transport complex A proteins. *J. Biol. Chem.* 287, 11689-11703.

Benzing, T., Gerke, P., Höpker, K., Hildebrandt, F., Kim, E., Walz, G. (2001) Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9784-9789.

Berbari, N., Lewis, J., Bishop, G., Askwith, C., Mykytyn, K. (2008) Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4242-4246.

Berbari, N., O'Connor, A., Haycraft, C., Yoder, B. (2009) The primary cilium as a complex signaling center. *Curr. Biol.* 19, R526-535.

Bergmann, C., Fliegauf, M., Bruchle, N., Frank, V., Olbrich, H., Kirschner, J., Schermer, B., Schmedding, I., Kispert, A., Kranzlin, B., Nürnberg, G., Becker, C., Grimm, T., Girschick, G., Lynch, S., Kelehan, P., Senderek, J., Neuhaus, T., Stallmach, T., Zentgraf, H., Nürnberg, P., Gretz, N., Lo, C., Lienkamp, S., Schäfer, T., Walz, G., Benzing, T., Zerres, K., Omran, H. (2008) Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 959-970.

Besschetnova, T., Kolpakova-Hart, E., Guan, Y., Zhou, J., Olsen, B., Shah, J. (2010) Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Curr. Biol.* 20, 182-187.

Besse, L., Neti, M., Anselme, I., Gerhardt, C., Rüther, U., Laclef, C., Schneider-Maunoury, S. (2011) Primary cilia control telencephalic patterning and morphogenesis via Gli3 proteolytic processing. *Development* 138, 2079-2088.

Bialas, N., Inglis, P., Li, C., Robinson, J., Parker, J., Healey, M., Davis, E., Inglis, C., Toivonen, T., Cottell, D., Blacque, O., Quarmby, L., Katsanis, N., Leroux, M. (2009) Functional interactions between the ciliopathyassociated Meckel Syndrome 1 (MKS1) protein and two novel MKS1-related (MKSR) proteins. *J. Cell Sci.* 122, 611-624.

Birnboim, H. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.

Birnboim, H., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

Blacque, O., Leroux, M. (2006) Bardet-Biedl syndrome: An emerging pathomechanism of intracellular transport. . *Cell Mol. Life Sci.* 63, 2145-2161.

Blacque, O., Perens, E., Boroevich, K., Inglis, P., Li, C., Warner, A., Khattra, J., Holt, R., Ou, G., Mah, A., McKay, S., Huang, P., Swoboda, P., Jones, S., Marra, M., Baillie, D., Moerman, D., Shaham, S., Leroux, M. (2005) Functional genomics of the cilium, a sensory organelle. *Curr. Biol.* 15, 935-941.

Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M., Sandoz, D. (1989) In vitro effects of taxol on ciliogenesis in quail oviduct. *J. Cell Sci.* 92, 9-20.

Bonnafe, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., Ucla, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubruille, R., Couble, P., Collignon, J., Durand, B., Reith, W. (2004) The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4417-4427.

Boquist, L. (1970) Cilia and vesicular particles in the endocrine pancreas of the Mongolian gerbil. *J. Cell Biol.* 45, 532-541.

Borgal, L., Habbig, S., Hatzold, J., Liebau, M., Dafinger, C., Sacarea, I., Hammerschmidt, M., Benzing, T., Schermer, B. (2012) The Ciliary Protein Nephrocystin-4 Translocates the Canonical Wnt-Regulator Jade-1 to the Nucleus to Negatively Regulate Beta-Catenin Signaling. *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print].

Bornens, M. (2002) Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 25-34.

Bornens, M., Paintrand, M., Berges, J., Marty, M., Karsenti, E. (1987) Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 238-249.

Bouck, G. (1971) The structure, origin, isolation, and composition of the tubular mastigonemes of the Ochromas flagellum. *J. Cell Biol.* 50, 362-384.

Boylan, J., Wright, A. (2000) Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Hum. Mol. Genet.* 9.

Brazelton, W., Amundsen, C., Silflow, C., Lefebvre, P. (2001) The bld1 mutation identifies the Chlamydomonas osm-6 homolog as a gene required for flagellar assembly. *Curr. Biol.* 11, 1591-1594.

Brinkley, B. (1985) Microtubule organizing centers. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 145-172.

Brito, D., Gouveia, S., Bettencourt-Dias, M. (2012) Deconstructing the centriole: structure and number control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 4-13.

Burcklé, C., Gaudé, H., Vesque, C., Silbermann, F., Salomon, R., Jeanpierre, C., Antignac, C., Saunier, S., Schneider-Maunoury, S. (2011) Control of the Wnt pathways

by nephrocystin-4 is required for morphogenesis of the zebrafish pronephros. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2611-2627.

Buttitta, L., Mo, R., Hui, C., Fan, C. (2003) Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* 130, 6233-6243.

Calvert, P., Schiesser, W., Pugh Jr, E. (2010) Diffusion of a soluble protein, photoactivatable GFP, through a sensory cilium. *J. Gen. Physiol.* 135, 173-196.

Campbell, N. (2000) Biologie. Spektrum Akademischer Verlag., Heidelberg.

Canettieri, G., Di Marcotullio, L., Greco, A., Coni, S., Antonucci, L., Infante, P., Pietrosanti, L., De Smaele, E., Ferretti, E., Miele, E., Pelloni, M., De Simone, G., Pedone, E., Gallinari, P., Giorgi, A., Steinkühler, C., Vitagliano, L., Pedone, C., Schinin, M., Screpanti, I., Gulino, A. (2010) Histone deacetylase and /Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nat. Cell Biol.* 12, 132-142.

Cano, D., Murcia, N., Pazour, G., Hebrok, M. (2004) Orpk mouse model of polycystic kidney disease reveals essential role of primary cilia in pancreatic tissue organization. *Development* 131, 3457-3467.

Capecchi, M. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292.

Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J., Bettencourt-Dias, M. (2011) Evolution: tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J. Cell Biol.* 194, 165-175.

Caspary, T., Larkins, C., Anderson, K. (2007) The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev. Cell* 12, 767-778.

Chen, M., Wilson, C., Li, Y., Law, K., Lu, C., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C., Chuang, P. (2009) Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* 23, 1910-1928.

Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L., Hass, P., Sandoval, W., Peterson, A. (2011) A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat. Cell Biol.* 14, 61-72.

Christensen, S., Pedersen, L., Schneider, L., Satir, P. (2007) Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic* 8, 97-109.

Coene, K., Mans, D., Boldt, K., Gloeckner, C., van Reeuwijk, J., Bolat, E., Roosing, S., Letteboer, S., Peters, T., Cremers, F., Ueffing, M., Roepman, R. (2011) The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3592-3605.

Cole, D. (2003) The intraflagellar transport machinery of Chlamydomonas reinhardtii. *Traffic* 4, 435-442.

Cole, D., Diener, D., Himelblau, A., Beech, P., Fuster, J., Rosenbaum, J. (1998) Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in Caenorhabditis elegans sensory neurons. *J. Cell Biol.* 141, 993-1008.

Cook, A., Bono, F., Jinek, M., Conti, E. (2007) Structural biology of nucleocytoplasmic transport. . *Annu. Rev. Biochem.* 76, 647-671.

Corbit, K., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A., Stainier, D., Reiter, J. (2005) Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018-1021.

Corbit, K., Shyer, A., Dowdle, W., Gaulden, J., Singla, V., Chen, M., Chuang, P., Reiter, J. (2008) Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat. Cell Biol.* 10, 70-76.

Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 801-847.

Cox, B., Briscoe, J., Ulloa, F. (2010) SUMOylation by Pias1 regulates the activity of the Hedgehog dependent Gli transcription factors. *PLoS One* 5, e11996.

Craige, B., Tsao, C., Diener, D., Hou, Y., Lechtreck, K., Rosenbaum, J., Witman, G. (2010) CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J. Cell Biol.* 190, 927-940.

Czarnecki, P., Shah, J.V. (2012) The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends in Cell Biol.* 22, 201-210.

da Fonseca, P., Morris, E. (2008) Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core. *J. Biol. Chem.* 283, 23305-23314.

Dammermann, A., Merdes, A. (2002) Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.* 159, 255-266.

Dawe, H., Smith, U., Cullinane, A., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., Afford, S., Copp, A., Kelly, D., Gull, K., Johnson, C. (2007) The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum. Mol. Genet.* 16, 173-186.

De Robertis, E. (1956) Electron microscope observations on the submicroscopic organization of the retinal rods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 319-330.

Deane, J., Cole, D., Seeley, E., Diener, D., Rosenbaum, J. (2001) Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr. Biol.* 11, 1586-1590.

Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C., Moutkine, I., Hellman, N., Anselme, I., Silbermann, F., Vesque, C., Gerhardt, C., Rattenberry, E., Wolf, M., Gubler, M., Martinovic, J., Encha-Razavi, F., Boddaert, N., Gonzales, M., Macher, M., Nivet, H., Champion, G.,

Berthélémé, J., Niaudet, P., McDonald, F., Hildebrandt, F., Johnson, C., Vekemans, M., Antignac, C., Rüther, U., Schneider-Maunoury, S., Attié-Bitach, T., Saunier, S. (2007) The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat. Genet.* 39, 875-881.

Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., Cohen, S. (2000) Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521-531.

Dick, T., Nussbaum, A., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D., Huber, R., Rammensee, H., Schild, H. (1998) Contribution of proteasomal betasubunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 273, 25637-25646.

Didier, C., Merdes, A., Gairin, J., Jabrane-Ferrat, N. (2008) Inhibition of proteasome activity impairs centrosome-dependent microtubule nucleation and organization. *Mol. Biol. Cell* 19, 1220-1229.

Dishinger, J., Kee, H., Jenkins, P., Fan, S., Hurd, T., Hammond, J., Truong, Y., Margolis, B., Martens, J., Verhey, K. (2010) Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nat. Cell Biol.* 12, 703-710.

Donaldson, J., Dempsey, P., Reddy, S., Bouton, A., Coffey, R., Hanks, S. (2000) Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 256, 168-178.

Donaldson, J., Dise, R., Ritchie, M., Hanks, S. (2002) Nephrocystin-conserved domains involved in targeting to epithelial cell-cell junctions, interaction with filamins, and establishing cell polarity. *J. Biol. Chem.* 277, 29028-29035.

Doolin, P., Birge, W. (1966) Ultrastructural organization of cilia and basal bodies of the epithelium of the choroid plexus in the chick embryo. *J. Cell Biol.* 29, 333-345.

Dowdle, W., Robinson, J., Kneist, A., Sirerol-Piquer, M., Frints, S., Corbit, K., Zaghloul, N., van Lijnschoten, G., Mulders, L., Verver, D., Zerres, K., Reed, R., Attié-Bitach, T., Johnson, C., García-Verdugo, J., Katsanis, N., Bergmann, C., Reiter, J. (2011) Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 94-110.

Doxsey, S., Stein, P., Evans, L., Calarco, P., Kirschner, M. (1994) Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 76, 639-650.

Duensing, A., Liu, Y., Perdreau, S., Kleylein-Sohn, J., Nigg, E., Duensing, S. (2007) Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* 26, 6280-6288.

Dute, R., Kung, C. (1978) Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in Paramecium tetraurelia. *J. Cell Biol.* 78, 451-464.

Echelard, Y., Epstein, D., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J., McMahon, A. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.

Efimenko, E., Blacque, O., Ou, G., Haycraft, C., Yoder, B., Scholey, J., Leroux, M., Swoboda, P. (2006) Caenorhabditis elegans DYF 2, an orthologue of human WDR19, is a component of the intraflagellar transport machinery in sensory cilia. *Mol. Biol. Cell* 17, 4801-4811.

Eley, L., Turnpenny, L., Yates, L., Craighead, A., Morgan, D., Whistler, C., Goodship, J., Strachan, T. (2004) A perspective on inversin. *Cell Biol. Int.* 28, 119-124.

Elsasser, S., Gali, R., Schwickart, M., Larsen, C., Leggett, D., Müller, B., Feng, M., Tübing, F., Dittmar, G., Finley, D. (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat. Cell Biol.* 4, 725-730.

Emmer, B., Maric, D., Engman, D. (2010) Molecular mechanisms of protein and lipid targeting to ciliary membranes. *J. Cell Sci.* 123, 529-536.

Eytan, E., Armon, T., Heller, H., Beck, S., Hershko, A. (1993) Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26 S protease complex. *J. Biol. Chem.* 268, 4668-4674.

Ezratty, E., Stokes, N., Chai, S., Shah, A., Williams, S., Fuchs, E. (2011) A role for the primary cilium in notch signaling and epidermal differentiation during skin development. *Cell* 145, 1129-1141.

Fabunmi, R., Wigley, W., Thomas, P., DeMartino, G. (2000) Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 409-413.

Fan, S., Fogg, V., Wang, Q., Chen, X., Liu, C., Margolis, B. (2007) A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin interactions. *J. Cell Biol.* 178, 387-398.

Finley, D. (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477-513.

Fisch, C., Dupuis-Williams, P. (2011) Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biol. Cell.* 103, 249-270.

Fliegauf, M., Benzing, T., Omran, H. (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 880-893.

Follit, J., San Agustin, J., Xu, F., Jonassen, J., Samtani, R., Lo, C., Pazour, G. (2008) The golgin GMAP210/TRIP11 anchors IFT20 to the golgi complex. *PLoS Genetics* 4, e1000315.

Follit, J., Tuft, R., Fogarty, K., Pazour, G. (2006) The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol. Biol. Cell* 17, 3781-3792.

Follit, J., Xu, F., Keady, B., Pazour, G. (2009) Characterization of mouse IFT complex B. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 457-468.

Fraser, A., Kamath, R., Zipperlein, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J. (2000) Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I ba systematic RNA interference. *Nature* 408, 325-330.

Gaertig, J., Wloga, D. (2008) Ciliary tubulin and its post-translational modifications. *Curr. Top. Dev. Biol.* 85, 83-113.

Gao, C., Wang, G., Amack, J., Mitchell, D. (2010) Oda16/Wdr69 is essential for axonemal dynein assembly and ciliary motility during zebrafish embryogenesis. *Dev. Dyn.* 239, 2190-2197.

Garcia-Gonzalo, F., Corbit, K., Sirerol-Piquer, M., Ramaswami, G., Otto, E., Noriega, T., Seol, A., Robinson, J., Bennett, C., Josifova, D., García-Verdugo, J., Katsanis, N., Hildebrandt, F., Reiter, J. (2011) A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat. Genet.* 43, 776-784.

Garcia-Gonzalo, F., Reiter, J. (2012) Scoring a backstage pass: Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *J. Cell Biol.* 197, 697-709.

Geimer, S., Melkonian, M. (2004) The ultrastructure of the Chlamydomonas reinhardtii basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J. Cell Sci.* 117, 2663-2674.

Gerdes, J., Davis, E., Katsanis, N. (2009) The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 137, 32-45.

Gerdes, J., Liu, Y., Zaghloul, N., Leitch, C., Lawson, S., Kato, M., Beachy, P., Beales, P., DeMartino, G., Fisher, S., Badano, J., Katsanis, N. (2007) Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat. Genet.* 39, 1350-1360.

Gerhardt, C. (2006) Analyse der ZNS-Veränderungen in Ftm-negativen Mäusen. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gerhardt, C. (2010) Kardiale Ziliopathie als Ursache perimembranöser ventrikulärer Septumdefekte. *Dissertation*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gerhart, J. (1999) 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology.* 60, 226-239.

Gherman, A., Davis, E., Katsanis, N. (2006) The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat. Genet.* 38, 961-962.

Gibbons, I., Grimstone, A. (1960) On flagellar structure in certain flagellates. *J. biochem. biophys. Cytol.* 7, 697-715.

Gilbert, S. (2000) Developmental Biology. Sinauer Associates.

Gillette, T., Kumar, B., Thompson, D., Slaughter, C., DeMartino, G. (2008) Differential roles of the COOH termini of AAA subunits of PA700 (19 S regulator) in asymmetric assembly and activation of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 283, 31813-31822.

Gilula, N., Satir, P. (1972) The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J. Cell Biol.* 53, 494-509.

Glickman, M., Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82, 373-428.

Gomez, T., Kolawa, N., Gee, M., Sweredoski, M., Deshaies, R. (2011) Identification of a functional docking site in the Rpn1 LRR domain for the UBA-UBL domain protein Ddi1. *BMC Biol.* 9, 33.

Gorden, N., Arts, H., Parisi, M., Coene, K., Letteboer, S., van Beersum, S., Mans, D., Hikida, A., Eckert, M., Knutzen, D., Alswaid, A., Ozyurek, H., Dibooglu, S., Otto, E., Liu, Y., Davis, E., Hutter, C., Bammler, T., Farin, F., Dorschner, M., Topçu, M., Zackai, E., Rosenthal, P., Owens, K., Katsanis, N., Vincent, J., Hildebrandt, F., Rubel, E., Raible, D., Knoers, N., Chance, P., Roepman, R., Moens, C., Glass, I., Doherty, D. (2008) CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 559-571.

Graser, S., Stierhof, Y., Lavoie, S., Gassner, O., Lamla, S., Le Clech, M., Nigg, E. (2007) Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J. Cell Biol.* 179, 321-330.

Grimpe, B. (2012) Deoxyribozymes and bioinformatics: complementary tools to investigate axon regeneration. *Cell Tissue Res.* 349, 181-200.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H., Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature* 386, 463-471.

Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D., Huber, R. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10976-10983.

Gu, F., Crump, C., Thomas, G. (2001) Trans-Golgi network sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1067-1084.

Guo, J., Yang, Z., Song, W., Chen, Q., Wang, F., Zhang, Q., Zhu, X. (2006) Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. *Mol. Biol. Cell* 17, 680-689.

Guterman, A., Glickman, M. (2004) Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function). *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 201-211.

Habbig, S., Bartram, M., Muller, R., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sägmüller, J., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M., Reinhardt, H., Benzing, T., Schermer, B. (2011) NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J. Cell Biol.* 193, 633-642.

Hagiwara, H., Ohwada, N., Aoki, T., Suzuki, T., Takata, K. (2008) Immunohistochemical and electron microscopic observations of stromal cells in the human oviduct mucosa. *Med. Mol. Morphol.* 41, 221-226.

Hanna, J., Hathaway, N., Tone, Y., Crosas, B., Elsasser, S., Kirkpatrick, D., Leggett, D., Gygi, S., King, R., Finley, D. (2006) Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell* 127, 99-111.

Hansen, D., Hsu, J., Kaiser, B., Jackson, P., Eldridge, A. (2002) Control of the centriole and centrosome cycles by ubiquitination enzymes. *Oncogene* 21, 6209-6221.

Hassounah, N., Bunch, T., McDermott, K. (2012) Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling. *Clin. Cancer Res.* 18, 2429-2435.

Haycraft, C., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E., Yoder, B. (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 1, e53.

Heidemann, S., McIntosh, J. (1980) Visualization of the structure polarity of microtubules. *Nature (Lond.)* 286, 517-519.

Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D. (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 272, 25200-25209.

Henneguy, L. (1898) Sur les rapports des cils vibratiles avec les centrosomes. . *Arch. Anat. Microscop.* 1, 482.

Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.

Hildebrandt, F., Attanasio, M., Otto, E. (2009) Nephronphthisis: Disease Mechanism of a Ciliopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 23-35.

Hilt, W., Wolf, D. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* 21, 96-102.

Hodges, M., Scheumann, N., Wickstead, B., Langdale, J., Gull, K. (2010) Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *J. Cell Sci.* 123, 407-413.

Hoelz, A., Debler, E., Blobel, G. (2011) The structure of the nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 613-643.

Hong, D., Pawlyk, B., Sokolov, M., Strissel, K., Yang, J., Tulloch, B., Wright, A., Arshavsky, V., Li, T. (2003) RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2413-2421.

Hong, D., Yue, G., Adamian, M., Li, T. (2001) Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGRr)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J. Biol. Chem.* 276, 12091-12099.

Hooper, J., Scott, M. (2005) Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 306-317.

Horner, V., Caspary, T. (2011) Disrupted dorsal neural tube BMP signaling in the cilia mutant Arl13b(hnn) stems from abnormal Shh signaling. *Dev. Biol.* 355, 43-54.

Hou, Y., Pazour, G., Witman, G. (2004) A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport. *Mol. Biol. Cell* 15, 4382-4394.

Hou, Y., Qin, H., Follit, J., Pazour, G., Rosenbaum, J., Witman, G. (2007) Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella. *J. Cell Biol.* 176, 653-665.

Houde, C., Dickinson, R., Houtzager, V., Cullum, R., Montpetit, R., Metzler, M., Simpson, E., Roy, S., Hayden, M., Hoodless, P., Nicholson, D. (2006) Hippi is essential for node cilia assembly and Sonic hedgehog signaling. *Dev. Biol.* 300, 523-533.

Hsiao, Y., Tuz, K., Ferland, R. (2012) Trafficking in and to the primary cilium. *Cilia* 1.

Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M., Nachury, M., Spiliotis, E., Nelson, W. (2010) A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* 329, 436-439.

Hu, Q., Nelson, W. (2011) Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68, 313-324.

Huang, L., Szymanska, K., Jensen, V., Janecke, A., Innes, A., Davis, E., Frosk, P., Li, C., Willer, J., Chodirker, B., Greenberg, C., McLeod, D., Bernier, F., Chudley, A., Müller, T., Shboul, M., Logan, C., Loucks, C., Beaulieu, C., Bowie, R., Bell, S., Adkins, J., Zuniga, F., Ross, K., Wang, J., Ban, M., Becker, C., Nürnberg, P., Douglas, S., Craft, C., Akimenko, M., Hegele, R., Ober, C., Utermann, G., Bolz, H., Bulman, D., Katsanis, N., Blacque, O., Doherty, D., Parboosingh, J., Leroux, M., Johnson, C., Boycott, K. (2011) TMEM237 is mutated in individuals with a Joubert syndrome related disorder and expands the role of the TMEM family at the ciliary transition zone. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 713-730.

Huang, P., Senga, T., Hamaguchi, M. (2007) A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 26, 4357-4371.

Huangfu, D., Anderson, K. (2005) Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11325-11330.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A., Murcia, N., Niswander, L., Anderson, K. (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83-87.

Hufnagel, L. (1983) Freeze-fracture analysis of membrane events during early neogenesis of cilia in Tetrahymena: changes in fairy-ring morphology and membrane topography. *J. Cell Sci.* 60, 137-156.

Hui, C., Angers, S. (2011) Gli proteins in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 10, 513-537.

Humke, E., Dorn, K., Milenkovic, L., Scott, M., Rohatgi, R. (2010) The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 24, 670-682.

Hurd, T., Fan, S., Margolis, B. (2011) Localization of retinitis pigmentosa 2 to cilia is regulated by Importin beta2. *J. Cell Sci.* 124, 718-726.

Ibañez-Tallon, I., Heintz, N., Omran, H. (2003) To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum. Mol. Genet.* 1, R27-35.

Ingham, P., McMahon, A. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059-3087.

Ingham, P., Nakano, Y., Seger, C. (2011) Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* 12, 393-406.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Iomini, C., Babaev-Khaimov, V., Sassaroli, M., Piperno, G. (2001) Protein particles in Chlamydomonas flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J. Cell Biol.* 153, 13-24.

Iomini, C., Li, L., Esparza, J., Dutcher, S. (2009) Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in Chlamydomonas reinhardtii. *Genetics* 183, 885-896.

Ishikawa, H., Marshall, W. (2011) Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 222-234.

Jager, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D., Heinemeyer, W. (1999) Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J. Mol. Biol.* 291, 997-1013.

Jainchill, J., Aaronson, S., Todaro, G. (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* 4, 549-553.

Jauregui, A., Barr, M. (2005) Functional characterization of the C. elegans nephrocystins NPHP-1 and NPHP-4 and their role in cilia and male sensory behaviors. *Exp. Cell Res.* 305, 333-342.

Jauregui, A., Nguyen, K., Hall, D., Barr, M. (2008) The Caenorhabditis elegans nephrocystins act as global modifiers of cilium structure. *J. Cell Biol.* 180, 973-988.

Jekely, G., Arendt, D. (2006) Evolution of intraflagellar transport from coated vesicles and autogenous origin of the eukaryotic cilium. *BioEssays* 28, 191-198.

Jiang, S., Chiou, Y., Wang, E., Chien, Y., Ho, H., Tsai, F., Lin, C., Tsai, S., Li, H. (2009) Essential role of nephrocystin in photoreceptor intraflagellar transport in mouse. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1566-1577.

Jin, H., White, S., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S., Bazan, J., Nachury, M. (2010) The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* 141, 1208-1219.

Johnson, K., Rosenbaum, J. (1992) Polarity of flagellar assembly in Chlamydomonas. *J. Cell Biol.* 119, 1605-1611.

Kee, H., Dishinger, J., Blasius, T., Liu, C., Margolis, B., Verhey, K. (2012) A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat. Cell Biol.* 14, 431-437. .

Khanna, H., Hurd, T., Lillo, C., Shu, X., Parapuram, S., He, S., Akimoto, M., Wright, A., Margolis, B., Williams, D., Swaroop, A. (2005) RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 33580-33587.

Khodjakov, A., Rieder, C. (1999) The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J. Cell Biol.* 146, 585-596.

Kim, J., Kato, M., Beachy, P. (2009) Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21666-21671.

Kim, M., Froese, C., Estey, M., Trimble, W. (2011) SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. . *J. Cell Biol.* 195, 815-826.

Kim, S., Shindo, A., Park, T., Oh, E., Ghosh, S., Gray, R., Lewis, R., Johnson, C., Attie-Bittach, T., Katsanis, N., Wallingford, J. (2010) Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* 329, 1337-1340.

Kisselev, A., Akopian, T., Goldberg, A. (1998) Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* 273, 1982-1989.

Kisselev, A., Akopian, T., Woo, K., Goldberg, A. (1999) Sizes of peptides generated during degradation of proteins by mammalian 20S and 26S proteasomes. *J. Biol. Chem.* 274, 3363-3371.

Kisselev, A., Goldberg, A. (2005) Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol.* 398, 364-378.

Knödler, A., Feng, S., Zhang, J., Zhang, X., Das, A., Peränen, J., Guo, W. (2010) Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6346-6351.

Kochanski, R., Borisy, G. (1990) Mode of centriole duplication and distribution. *J. Cell Biol.* 110, 1599-1605.

Kodani, A., Tonthat, V., Wu, B., Sütterlin, C. (2010) Par6 alpha interacts with the dynactin subunit p150 Glued and is a critical regulator of centrosomal protein recruitment. *Mol. Biol. Cell* 21, 3376-3385.

Kogan, S., Doherty, M., Gitschier, J. (1987) An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 317, 985-990.

Kozminski, K., Beech, P., Rosenbaum, J. (1995) The Chlamydomonas kinesin- like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.* 131, 1517-1527.

Kozminski, K., Johnson, K., Forscher, P., Rosenbaum, J. (1993) A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5519-5523.

Kyttala, M., Tallila, J., Salonen, R., Kopra, O., Kohlschmidt, N., Paavola-Sakki, P., Peltonen, L., Kestila, M. (2006) MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel Syndrome. *Nat. Genet.* 38, 155-157.

Lam, Y., Xu, W., DeMartino, G., Cohen, R. (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 385, 737-740.

Lander, G., Estrin, E., Matyskiela, M., Bashore, C., Nogales, E., Martin, A. (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482, 186-191.

Larkins, C., Aviles, G., East, M., Kahn, R., Caspary, T. (2011) Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. *Mol. Biol. Cell* 22, 4694-4703.

Lechtreck, K., Johnson, E., Sakai, T., Cochran, D., Ballif, B., Rush, J., Pazour, G., Ikebe, M., Witman, G. (2009) The Chlamydomonas reinhardtii BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella. *J. Cell Biol.* 187, 1117-1132.

Lee, D., Goldberg, A. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8, 397-403.

Lee, J., Gleeson, J. (2010) The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiol. Dis.* 38, 167-172.

Leggett, D., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R., Walz, T., Ploegh, H., Finley, D. (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol. Cell* 10, 495-507.

Lei, Q., Zelman, A., Kuang, E., Li, S., Matise, M. (2004) Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* 131, 3593-3604.

Lenhossek, v., M. (1898) Über Flimmerzellen. *Verhandl. Anat. Ges. Kiel.* 12, 106.

Liebau, M., Hopker, K., Muller, R., Schmedding, I., Zank, S., Schairer, B., Fabretti, F., Höhne, M., Bartram, M., Dafinger, C., Hackl, M., Burst, V., Habbig, S., Zentgraf, H., Blaukat, A., Walz, G., Benzing, T., Schermer, B. (2011) Nephrocystin-4 regulates Pyk2-induced tyrosine phosphorylation of nephrocystin-1 to control targeting to monocilia. *J. Biol. Chem.* 286, 14237-14245.

Liem, J., KF, Ashe, A., He, M., Satir, P., Moran, J., Beier, D., Wicking, C., Anderson, K. (2012) The IFT-A complex regulates Shh signaling through cilia structure and membrane protein trafficking. *J. Cell Biol.* 197, 789-800.

Liem, J., KF, He, M., Ocbina, P., Anderson, K. (2009) Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *PNAS* 106, 13377-13382.

Lier, J. (2008) Charakterisierung von Ftm-Funktionen in Zellkultur und Tier. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A., Goldstein, L., Somlo, S., Igarashi, P. (2003) Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5286-5291.

Lin, S. (2009) Identifikation und Charakterisierung von Ftm-Domänen-spezifischen Interaktionspartnern. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Lin, Y., Yan, M., Shih, Y., Hsieh, C. (2009) The basal body gene, RPGRIP1L, is a candidate tumour suppressor gene in human hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* 45, 2041-2049.

Lingle, W., Lutz, W., Ingle, J., Maihle, N., Salisbury, J. (1998) Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2950-2955.

Liu, A., Wang, B., Niswander, L. (2005) Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* 132, 3103-3111.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2001) Molekulare Zellbiologie. Spektrum, Akademischer Verlag.

Lucker, B., Behal, R., Qin, H., Siron, L., Taggart, W., Rosenbaum, J., Cole, D. (2005) Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits. *J. Biol. Chem.* 280, 27688-27696.

Mahuzier, A., Gaudé, H., Grampa, V., Anselme, I., Silbermann, F., Leroux-Berger, M., Delacour, D., Ezan, J., Montcouquiol, M., Saunier, S., Schneider-Maunoury, S., Vesque, C. (2012) Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip1l is essential for planar cell polarity. *J. Cell Biol.* 198, 927-940.

Matsuura, K., Lefebvre, P., Kamiya, R., Hirono, M. (2002) Kinesin-II is not essential for mitosis and cell growth in Chlamydomonas. *Cell Mot. Cyto.* 52, 195-201.

Mavlyutov, T., Zhao, H., Ferreira, P. (2002) Species-specific subcellular localization of RPGR and RPGRIP isoforms: implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1899-1907.

May, S., Ashique, A., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J., Peterson, A. (2005) Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev. Biol.* 287, 378-389.

McDermott, A., Gustafsson, M., Elsam, T., Hui, C., Emerson, C.J., Borycki, A. (2005) Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development* 132, 345-357.

McGlashan, S., Knight, M., Chowdhury, T., Joshi, P., Jensen, C., Kennedy, S., Poole, C. (2010) Mechanical loading modulates chondrocyte primary cilia incidence and length. *Cell Biol. Int.* 24, 441-446.

McMahon, A., Ingham, P., Tabin, C. (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. . *Curr. Top. Dev. Biol.* 53, 1-114.

Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L., Kaiser, P. (2008) Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 7, 4566-4576.

Menco, M. (1980) Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dog. IV. Ciliogenesis and ciliary necklaces (including high-voltage observations). *Cell Tissue Res.* 212, 1-16.

Misquitta, L., Paterson, B. (1999) Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1451-1456.

Mogensen, M. (1999) Microtubule release and capture in epithelial cells. *Biol. Cell* 91, 331-341.

Mogensen, M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., Bornens, M. (2000) Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non- centrosomal sites: the role of ninein. *J. Cell Sci.* 113, 3013-3023.

Molla-Herman, A., Ghossoub, T., Blisnick, A., Meunier, C., Serres, F., Silbermann, C., Emmerson, K., Romeo, P., Bourdoncle, A., Schmitt, A., Saunier, S., Spassky, N., Bastin, P., Benmerah, A. (2010) The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J. Cell Sci.* 123, 1785-1795.

Mollet, G., Silbermann, F., Delous, M., Salomon, R., Antignac, C., Saunier, S. (2005) Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes. *Hum. Mol. Genet.* 14, 645-656.

Motoyama, J., Milenkovic, L., Iwama, M., Shikata, Y., Scott, M., Hui, C. (2003) Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Dev. Biol.* 259, 150-161.

Murcia, N., Richards, W., Yoder, B., Mucenski, M., Dunlap, J., Woychik, R. (2000) The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* 127, 2347-2355.

Murga-Zamalloa, C., Atkins, S., Peranen, J., Swaroop, A., Khanna, H. (2010) Interaction of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) with RAB8A GTPase: implications for cilia dysfunction and photoreceptor degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3591-3598.

Nachury, M., Loktev, A., Zhang, Q., Westlake, C., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D., Scheller, R., Bazan, J., Sheffield, V., Jackson, P. (2007) A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129, 1201-1213.

Nachury, M., Seeley, E., Jin, H. (2010) Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 59-87.

Najafi, M., N.A. Maza, N., Calvert, P. (2012) Steric volume exclusion sets soluble protein concentrations in photoreceptor sensory cilia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 203-208.

Nakata, K., Shiba, D., Kobayashi, D., Yokoyama, T. (2012) Targeting of Nphp3 to the primary cilia is controlled by an N-terminal myristoylation site and coiled-coil domains. *Cytoskeleton (Hoboken).* 69, 221-234.

Nauli, S., Alenghat, F., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A., Lu, W., Brown, E., Quinn, S., Ingber, D., Zhou, J. (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33, 129-137.

Neugebauer, J., Amack, J., Peterson, A., Bisgrove, B., Yost, H. (2009) FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* 458, 651-654.

Nogales, E., Downing, K., Amos, L., Löwe, J. (1998) Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct Biol.* 5, 451-458.

Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., Hamada, H. (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96-99.

Nürnberger, J., Bacallao, R., Phillips, C. (2002) Inversin Forms a Complex with Catenins and N-Cadherin in Polarized Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 3096-3106.

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* 287, 795-801.

O'Regan, L., Fry, A. (2009) The Nek6 and Nek7 Protein Kinases Are Required for Robust Mitotic Spindle Formation and Cytokinesis. *Mol. Cell Biol.* 29, 3975-3990.

Oishi, I., Kawakami, Y., Raya, A., Callol-Massot, C., Izpisua Belmonte, J. (2006) Regulation of primary cilia formation and left-right patterning in zebrafish by a noncanonical Wnt signaling mediator, duboraya. *Nat. Genet.* 38, 1316-1322.

Olbrich, H., Fliegauf, M., Hoefele, J., Kispert, A., Otto, E., Volz, A., Wolf, M., Sasmaz, G., Trauer, U., Reinhardt, R., Sudbrak, R., Antignac, C., Gretz, N., Walz, G., Schermer, B., Benzing, T., Hildebrandt, F., Omran, H. (2003) Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapetoretinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat. Genet.* 34, 455-459.

Omran, H. (2010) NPHP proteins: gatekeepers of the ciliary compartment. *J. Cell Biol.* 190, 715-717.

Orlowski, M., Cardozo, C., Michaud, C. (1993) Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. . *Biochemistry* 32, 1563-1572.

Orlowski, M., Wilk, S. (2000) Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 383, 1-16.

Otto, E., Loeys, B., Khanna, H., Hellemans, J., Sudbrak, R., Fan, S., Muerb, U., O'Toole, J., Helou, J., Attanasio, M., Utsch, B., Sayer, J., Lillo, C., Jimeno, D., Coucke, P., De Paepe, A., Reinhardt, R., Klages, S., Tsuda, M., Kawakami, I., Kusakabe, T., Omran, H., Imm, A., Tippens, M., Raymond, P., Hill, J., Beales, P., He, S., Kispert, A., Margolis, B., Williams, D., Swaroop, A., Hildebrandt, F. (2005) Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat. Genet.* 37, 282-288.

Otto, E., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J., Hiller, K., Mueller, A., Ruf, R., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., Foreman, J., Goodship, J., Strachan, T., Kispert, A., Wolf, M., Gagnadoux, M., Nivet, H., Antignac, C., Walz, G., Drummond, I., Benzing, T., Hildebrandt, F. (2003) Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat. Genet.* 34, 413-420.

Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H., Bornens, M. (1992) Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J. Struct. Biol.* 108, 107-128.

Pan, J., Snell, W. (2007) The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* 129, 1255-1257.

Pan, Y., Bai, C., Joyner, A., Wang, B. (2006) Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell Biol.* 26, 3365-3377.

Papermaster, D., Schneider, B., Besharse, J. (1985) Vesicular transport of newly synthesized opsin from the Golgi apparatus toward the rod outer segment. Ultrastructural immunocytochemical and autoradiographic evidence in Xenopus retinas. . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 1386-1404.

Parisi, M., Doherty, D., Chance, P., Glass, I. (2007) Joubert syndrome (and related disorders). *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 511-521.

Patil, H., Tserentsoodol, N., Saha, A., Hao, Y., Webb, M., Ferreira, P. (2012) Selective loss of RPGRIP1-dependent ciliary targeting of NPHP4, RPGR and SDCCAG8 underlies the degeneration of photoreceptor neurons. *Cell Death Dis.* 19, e355.

Patzke, S., Hauge, H., Sioud, M., Finne, E., Sivertsen, E., Delabie, J., Stokke, T., Aasheim, H. (2005) Identification of a novel centrosome/microtubule-associated coiled-coil protein involved in cell-cycle progression and spindle organization. *Oncogene* 24, 1159-1173.

Patzke, S., Redick, S., Warsame, A., Murga-Zamalloa, C., Khanna, H., Doxsey, S., Stokke, T. (2010) CSPP is a ciliary protein interacting with Nephrocystin 8 and required for cilia formation. *Mol. Biol. Cell* 21, 2555-2567.

Patzke, S., Stokke, T., Aasheim, H. (2006) CSPP and CSPP-L associate with centrosomes and microtubules and differently affect microtubule organization. *J. Cell Physiol.* 209, 199-210.

Pazour, G., Baker, S., Deane, J., Cole, D., Dickert, B., Rosenbaum, J., Witman, G., Besharse, J. (2002) The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* 157, 103-113.

Pazour, G., Dickert, B., Vucica, Y., Seeley, E., Rosenbaum, J., Witman, G., Cole, D. (2000) Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* 151, 709-718.

Pazour, G., Dickert, B., Witman, G. (1999) The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J. Cell Biol.* 144, 473-481.

Péchart, I., Kann, M., Levilliers, N., Bré, M., Fouquet, J. (1999) Composition and organization of tubulin isoforms reveals a variety of axonemal models. *Biol. Cell* 91, 685-697.

Pedersen, L., Geimer, S., Rosenbaum, J. (2006) Dissecting the molecular mechanisms of intraflagellar transport in chlamydomonas. *Curr. Biol.* 16, 450-459.

Pedersen, L., Rosenbaum, J. (2008) Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. . *Curr. Top. Dev. Biol.* 85, 23-61.

Perrone, C., Tritschler, D., Taulman, P., Bower, R., Yoder, B., Porter, M. (2003) A novel dynein light intermediate chain colocalizes with the retrograde motor for intraflagellar transport at sites of axoneme assembly in Chlamydomonas and mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 2041-2056.

Peters, K., Palade, G., Schneider, B., Papermaster, D. (1983) Fine structure of a periciliary ridge complex of frog retinal rod cells revealed by ultrahigh resolution scanning electron microscopy. *J. Cell Biol.* 96, 265-276.

Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R., Rüther, U. (2002) The mouse Fused toes (Ft) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm. Genome* 13, 186-188.

Phillips, C., Miller, K., Filson, A., Nurnberge, r.J., Clendenon, J., Cook, G., Dunn, K., Overbeek, P., Gattone, V., Bacallao, R. (2004) Renal cysts of inv/inv mice resemble early infantile nephronophthisis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1744-1755.

Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C., Bornens, M. (2000) The Respective Contributions of the Mother and Daughter Centrioles to Centrosome Activity and Behavior in Vertebrate Cells. *J. Cell Biol.* 149.

Pihan, G., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P., Doxsey, S. (1998) Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 58, 3974-3985.

Piperno, G., Siuda, E., Henderson, S., Segil, M., Vaananen, H., Sassaroli, M. (1998) Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *J. Cell Biol.* 143, 1591-1601.

Placzek, M. (1995) The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 499-506.

Plotnikova, O., Golemis, E., Pugacheva, E. (2008) Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res.* 68, 2058-2061.

Pluthero, F. (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucl.Acids Res.* 21, 20.

Porter, M., Bower, R., Knott, J., Byrd, P., Dentler, W. (1999) Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in Chlamydomonas. *Mol. Biol. Cell* 10, 693-712.

Poruchynsky, M., Sackett, D., Robey, R., Ward, Y., Annunziata, C., Fojo, T. (2008) Proteasome inhibitors increase tubulin polymerization and stabilization in tissue culture cells: a possible mechanism contributing to peripheral neuropathy and cellular toxicity following proteasome inhibition. *Cell Cycle* 7, 940-949.

Purkinje, J., Valentin, G. (1835) Bemerkung über die Unabhängigkeit der Flimmerbewegungen der Wirbelthiere von der Integrität des centralen Nervensystems. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*, 159-160.

Qin, H., Diener, D., Geimer, S., Cole, D., Rosenbaum, J. (2004) Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J. Cell Biol.* 164, 255-266.

Quintyne, N., Schroer, T. (2002) Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. *J. Cell Biol.* 159, 245-254.

Rabl, J., Smith, D., Yu, Y., Chang, S., Goldberg, A., Cheng, Y. (2008) Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol. Cell* 30, 360-368.

Rachel, R., May-Simera, H., Veleri, S., Gotoh, N., Choi, B., Murga-Zamalloa, C., McIntyre, J., Marek, J., Lopez, I., Hackett, A., Brooks, M., den Hollander, A., Beales, P., Li, T., Jacobson, S., Sood, R., Martens, J., Liu, P., Friedman, T., Khanna, H., Koenekoop, R., Kelley, M., Swaroop, A. (2012) Combining Cep290 and Mkks ciliopathy alleles in mice rescues sensory defects and restores ciliogenesis. *J. Clin. Invest.* 122, 1233-1245.

Reese, T. (1965) Olfactory cilia in the frog. *J. Cell Biol.* 25, 209-230.

Reiter, J., Skarnes, W. (2006) Tectonic, a novel regulator of the Hedgehog pathway required for both activation and inhibition. . *Genes Dev.* 20, 22-27.

Rieder, C., Borisy, G. (1982) The centrosome cycle in PtK2 cells: asymmetric distribution and structural change in the pericentriolar material. *Biol. Cell* 44, 117-132.

Rieder, C., Jensen, C., Jensen, L. (1979) The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK 1) cell line. *J. Ultrastruct. Res.* 68, 173-185.

Ringo, D. (1967) Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in Chlamydomonas. *J. Cell Biol.* 33, 543-571.

Rodbell, M. (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284, 17–22.

Roepman, R., Letteboer, S., Arts, H., van Beersum, S., Lu, X., Krieger, E., Ferreira, P., Cremers, F. (2005) Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18520-18525.

Rohatgi, R., Milenkovic, L., Corcoran, R., Scott, M. (2009) Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3196-3201.

Rohatgi, R., Milenkovic, L., Scott, M. (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372-376.

Rohatgi, R., Snell, W. (2010) The ciliary membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 541-546.

Rosenbaum, J., Child, F. (1967) Flagellar regeneration in protozoan flagellates. *J. Cell Biol.* 34, 345-364.

Rosenbaum, J., Witman, G. (2002) Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 813-825.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Salonen, R., Paavola, P. (1998) Meckel syndrome. *J. Med. Genet.* 35, 497-501.

Sambrook, J., Fritsch, E., Manitatis, T. (1989) Molecular cloning. *Springer Verlag.*

Sang, L., Miller, J., Corbit, K., Giles, R., Brauer, M., Otto, E., Baye, L., Wen, X., Scales, S., Kwong, M., Huntzicker, E., Sfakianos, M., Sandoval, W., Bazan, J., Kulkarni, P., Garcia-Gonzalo, F., Seol, A., O'Toole, J., Held, S., Reutter, H., Lane, W., Rafiq, M., Noor, A., Ansar, M., Devi, A., Sheffield, V., Slusarski, D., Vincent, J., Doherty, D., Hildebrandt, F., Reiter, J., Jackson, P. (2011) Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* 145, 513-528.

Sasai, N., Briscoe, J. (2012) Primary cilia and graded Sonic Hedgehog signalling. *WIREs. Dev. Biol.* 1, 753-772.

Sattler, C., Staehelin, L. (1974) Ciliary membrane differentiations in Tetrahymena pyriformis. Tetrahymena has four types of cilia. *J. Cell Biol.* 62, 473-490.

Schnackenberg, B., Palazzo, R. (1999) Identification and function of the centrosome centromatrix. . *Biol. Cell* 91, 429-438.

Schneider, L., Clement, C., Teilmann, S., Pazour, G., Hoffmann, E., Satir, P., Christensen, S. (2005) PDGFRalphaalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr. Biol.* 15, 1861-1866.

Scholey, J., Anderson, K. (2006) Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell* 125, 439-442.

Schubert, U., Anto´ n, L., Gibbs, J., Norbury, C., Yewdell, J., Bennink, J. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Schwartz, A., Ciechanover, A. (1999) The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57-74.

Sedmak, T., Wolfrum, U. (2010) Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of the retina. *J. Cell Biol.* 189, 171-186.

Sedmak, T., Wolfrum, U. (2011) Intraflagellar transport proteins in ciliogenesis of photoreceptor cells. *Biol. Cell* 103, 449-466.

Shiba, D., Manning, D., Koga, H., Beier, D., Yokoyama, T. (2010) Inv acts as a molecular anchor for Nphp3 and Nek8 in the proximal segment of primary cilia. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 112-119.

Shiba, D., Takamatsu, T., Yokoyama, T. (2005) Primary cilia of inv/inv mouse renal epithelial cells sense physiological fluid flow: bending of primary cilia and Ca2+ influx. *Cell Struct. Funct.* 30, 93-100.

Shiba, D., Yamaoka, Y., Hagiwara, H., Takamatsu, T., Hamada, H., Yokoyama, T. (2009) Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region. *J. Cell Sci.* 122, 44-54.

Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T., Walz, G. (2005) Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat. Genet.* 37, 537-543.

Singla, V., Reiter, J. (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313, 629-633.

Smith, D., Chang, S., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., Goldberg, A. (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol. Cell* 27, 731-744.

Song, L., Dentler, W. (2001) Flagellar protein dynamics in Chlamydomonas. *J. Biol. Chem.* 276, 29754-29763.

Song, Y., Mandelkow, E. (1993) Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1671-1675.

Sorokin, A., Kim, E., Ovchinnikov, L. (2009) Proteasome System of Protein Degradation and Processing. *Biochemistry (Moscow)* 74, 1411-1442.

Sorokin, S. (1962) Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 15, 363-377.

Sorokin, S. (1968) Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* 3, 207-230.

Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksöz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., Birchmeier, W., Lehrach, H., Wanker, E. (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 122, 957-968.

Stephens, R. (2000) Preferential incorporation of tubulin into the junctional region of ciliary outer doublet microtubules: a model for treadmilling by lattice dislocation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 130-140.

Sütterlin, C., Colanzi, A. (2010) The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *JCB* 188, 621-628.

Tabin, C. (1991) Retinoids, homeoboxes, and growth factors: Toward molecular models for limb development. *Cell* 66, 199-217.

Tallila, J., Jakkula, E., Peltonen, L., Salonen, R., Kestilä, M. (2008) Identification of CC2D2A as a Meckel syndrome gene adds an important piece to the ciliopathy puzzle. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1361-1367.

Tanaka, K., Li, K., Ichihara, A., Waxman, L., Goldberg, A. (1986) A High Molecular Weight Protease in theC ytosol of Rat Liver. *J. Biol. Chem.* 261, 15197-15203.

Taschner, M., Bhogaraju, S., Lorentzen, E. (2012) Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation* 83, S12-22.

Tassin, A., Bornens, M. (1999) Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol. Cell* 91, 343-354.

Teglund, S., Toftgard, R. (2010) Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1805, 181-208.

Tempe, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M., Concordet, J. (2006) Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3β phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFβTrCP. *Mol. Cell Biol.* 26, 4316-4326.

Thrower, J., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J.* 19, 94-102.

Tomko, R.J., Funakoshi, M., Schneider, K., Wang, J., Hochstrasser, M. (2010) Heterohexameric ring arrangement of the eukaryotic proteasomal ATPases: implications for proteasome structure and assembly. *Mol. Cell* 38, 393-403.

Tran, P., Haycraft, C., Besschetnova, T., Turbe-Doan, A., Stottmann, R., Herron, B., Chesebro, A., Qiu, H., Scherz, P., Shah, J., Yoder, B., Beier, D. (2008) THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat. Genet.* 40, 403-410.

Tsao, C., Gorovsky, M. (2008) Tetrahymena IFT122A is not essential for cilia assembly but plays a role in returning IFT proteins from the ciliary tip to the cell body. *J. Cell Sci.* 121, 428-436.

Tucker, R., Pardee, A., Fujiwara, K. (1979) Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* 17, 527-535.

Turing, A. (1952) The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lon. B.* 237, 37–72.

Tuson, M., He, M., Anderson, K. (2011) Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development* 138, 4921-4930.

Vabulas, R., Hartl, F. (2005) Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* 310, 1960-1963.

Van Reeuwijk, J., Arts, H., Roepman, R. (2011) Scrutinizing ciliopathies by unraveling ciliary interaction networks. *Hum. Mol. Genet.* 20, R149- R157.

Verheyen, E., Gottardi, C. (2010) Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev. Dyn.* 239, 34-44.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W., Yates, J.r., Koonin, E., Deshaies, R. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615.

Vetter, M. (2006) Analyse von Ftm-Interaktionspartnern. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Vierkotten, J. (2006) Funktionsanalyse von Ftm: Identifizierung einer neuen Komponente des zilienassoziierten Shh-Signalweges. *Dissertation*, Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B., Rüther, U. (2007) Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* 134, 2569-2577.

Vilchez, D., Boyer, L., Morantte, I., Lutz, M., Merkwirth, C, Joyce, D., Spencer, B., Page, L., Masliah, E., Berggren, W., Gage, F., Dillin, A. (2012) Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature* 489, 304-308.

Vincensini, L., Blisnick, T., Bastin, P. (2011) 1001 model organisms to study cilia and flagella. *Biol. Cell* 103, 109-130.

Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 615-619.

Vorobjev, I., Chentsov, Y. (1982) Centrioles in the Cell Cycle . I . Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* 98, 938-949.

Wallingford, J., Mitchell, B. (2011) Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev.* 25, 201-213. .

Walther, Z., Vashishtha, M., Hall, J. (1994) The Chlamydomonas FLA10 gene encodes a novel kinesin-homologous protein. *J. Cell Biol.* 126, 175-188.

Wang, B., Fallon, J., Beachy, P. (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100, 423-434.

Wang, B., Li, Y. (2006) Evidence for the direct involvement of βTrCP in Gli3 protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 33-38.

Warburton-Pitt, S., Jauregui, A., Li, C., Wang, J., Leroux, M., Barr, M. (2012) Ciliogenesis in Caenorhabditis elegans requires genetic interactions between ciliary middle segment localized NPHP 2 (inversin) and transition zone-associated proteins. *J. Cell Sci.* 125, 2592-2603.

Warner, F., Satir, P. (1973) The substructure of ciliary microtubules. *J. Cell Sci.* 12, 313-326.

Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T., Hamada, H. (2003) The left-right determinant Inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* 130, 1725-1734.

Weatherbee, S., Niswander, L., Anderson, K. (2009) A mouse model for Meckel syndrome reveals Mks1 is required for ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4565-4575.

Wei, Q., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Ling, K., Hu, J. (2012) The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. *Nat. Cell Biol.* 14, 950-957.

Weirich, C., Erzberger, J., Barral, Y. (2008) The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 478-489.

Wen, X., Lai, C., Evangelista, M., Hongo, J., de Sauvage, F., Scales, S. (2010) Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. *Mol. Cell Biol.* 30, 1910-1922.

Westlake, C., Baye, L., Nachury, M., Wright, K., Ervin, K., Phu, L., Chalouni, C., Beck, J., Kirkpatrick, D., Slusarski, D., Sheffield, V., Scheller, R., Jackson, P. (2011) Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPPII) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2759-2764.

Wheatley, D. (2005) Landmarks in the first hundred years of primary (9+0) cilium research. *Cell Biol. Int.* 29, 333-339.

Wianny, F., Zernicka-Goetz, M. (2000) Specific interference with gene function by doublestranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-75.

Wiese, C., Zheng, Y. (1999) Tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 250-259.

Wigley, W., Fabunmi, R., Lee, M., Marino, C., Muallem, S., DeMartino, G., Thomas, P. (1999) Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell Biol.* 145, 481-490.

Williams, C., Li, C., Kida, K., Inglis, P., Mohan, S., Semenec, L., Bialas, N., Stupay, R., Chen, N., Blacque, O., Yoder, B., Leroux, M. (2011) MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J. Cell Biol.* 192, 1023-1041.

Williams, C., Winkelbauer, M., Schafer, J., Michaud, E., Yoder, B. (2008) Functional redundancy of the B9 proteins and nephrocystins in Caenorhabditis elegans ciliogenesis. *Mol. Biol. Cell* 19, 2154-2168.

Winkelbauer, M., Schafer, J., Haycraft, C., Swoboda, P., Yoder, B. (2005) The C. elegans homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *J. Cell Sci.* 118, 5575-5587.

Wolf, M., Saunier, S., O'Toole, J., Wanner, N., Groshong, T., Attanasio, M., Salomon, R., Stallmach, T., Sayer, J., Waldherr, R., Griebel, M., Oh, J., Neuhaus, T., Josefiak, U., Antignac, C., Otto, E., Hildebrandt, F. (2007) Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis. *Kidney Int.* 72, 1520-1526.

Won, J., Marín de Evsikova, C., Smith, R., Hicks, W., Edwards, M., Longo-Guess, C., Li, T., Naggert, J., Nishina, P. (2011) NPHP4 is necessary for normal photoreceptor ribbon synapse maintenance and outer segment formation, and for sperm development. *Hum. Mol. Genet.* 20, 482-496.

Wright, K., Baye, L., Olivier-Mason, A., Mukhopadhyay, S., Sang, L., Kwong, M., Wang, W., Pretorius, P., Sheffield, V., Sengupta, P., Slusarski, D., Jackson, P. (2011) An ARL3-UNC119-RP2 GTPase cycle targets myristoylated NPHP3 to the primary cilium. *Genes Dev.* 25, 2347-2360.

Yao, T., Cohen, R. (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407.

Ye, Y., Rape, M. (2009) Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 755-764.

Yost, C., Torres, M., Miller, J., Huang, E., Kimelman, D., Moon, R. (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10, 1443-1454.

Young, A., Dictenberg, J., Purohit, A., Tuft, R., Doxsey, S. (2000) Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol. Biol. Cell* 11, 2047-2056.

Yue, S., Chen, Y., Cheng, S. (2009) Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 28, 492-499.

Zaghloul, N., Katsanis, N. (2009) Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J. Clin. Invest.* 119, 428-437.

Zhang, Q., Zhang, L., Wang, B., Ou, C., Chien, C., Jiang, J. (2006) A hedgehog-induced BTB protein modulates hedgehog signaling by degrading Ci/Gli transcription factor. *Dev. Cell* 10, 719-729.

Zhao, C., Malicki, J. (2011) Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos. *EMBO J.* 30, 2532-2544.

Zhao, Y., Hong, D., Pawlyk, B., Yue, G., Adamian, M., Grynberg, M., Godzik, A., Li, T. (2003) The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3965-3970.

Zheng, Y., Wong, M., Alberts, B., Mitchison, T. (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578-583.

Zhu, A., Zheng, L., Suyama, K., Scott, M. (2003) Altered localization of Drosophila Smoothened protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev.* 17, 1240-1252.

10 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther, der mir nicht nur das interessante Projekt überlassen hat, sondern mich mit seinen hilfreichen Anregungen jederzeit unterstützte.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Für die Durchführung der Massenspektrometrie bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke und Dr. Michael Reinartz.

Ferner bedanke ich mich bei Kathrin, Stephan und den restlichen Mitgliedern des EMTs für viel Hilfsbereitschaft sowie ein gutes Arbeitsklima. Ein ganz besonderer Dank geht an Christoph für die wertvolle Hilfe und die spaßigen Momente im „Kabuff".

Ebenso möchte ich mich bei Daniela und Robert für das Interesse an der Arbeit bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt Markus für den Rückhalt und die Motivation, aber auch die Ablenkung in den vergangenen Jahren.

Widmen möchte ich diese Dissertation meiner Großmutter und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Johanna Lier)