



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Analyse der Funktion des
Transitionszonenproteins Rpgrip11 und der damit
verbundenen molekularen Ursachen der
Ausbildung von Ziliopathien**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Antonia Wiegering
aus Ahaus

Düsseldorf, September 2018

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Rüter

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	5
2	Abstract	7
3	Einleitung.....	9
3.1	Die Zilie	9
3.1.1	Aufbau und Struktur der Zilie	10
3.1.2	Die ziliäre Transitionszone.....	13
3.1.3	Die Transitionszonen-Assemblierungshierarchie	15
3.1.4	Der Zilien-assoziierte Hedgehog-Signalweg	17
3.2	Ziliopathien	19
3.3	Das Transitionszonenprotein Rpgrip1l	21
3.4	Mechanismen der Proteindegradation in Wirbeltieren	23
3.4.1	Proteasomale Degradation und Rpgrip1l	24
3.4.2	Autophagie und Zilie	27
4	Zielsetzung	31
5	Originalarbeiten.....	32
5.1	Regulation des Hedgehog-Signalwegs durch das ziliäre Proteasom	32
5.1.1	Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils	32
5.1.2	Publikation (Gerhardt et al., 2016b).....	33
5.2	Die Rolle des Hedgehog-Signalwegs in der Ausbildung des ventrikulären Septums.....	50
5.2.1	Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils	50
5.2.2	Publikation (Wiegering et al., 2017).....	51
5.3	Das ziliäre Protein Rpgrip1l steuert Autophagie unabhängig von seiner Proteasom-regulierenden Funktion an der ziliären Basis in embryonalen Maus-Fibroblasten	66
5.3.1	Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils	66
5.3.2	Publikation (Struchtrup et al., 2018)	68
5.4	Zelltyp-spezifische Regulation der Transitionszonen-Assemblierung in Wirbeltieren	86
5.4.1	Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils	86
5.4.2	Publikation (Wiegering et al., 2018a).....	88

5.5 Die Funktion des ziliären Proteins Rpgr11 in der Entwicklung und Krankheitsausbildung.....	113
5.5.1 Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils	113
5.5.2 Publikation (Wiegering et al., 2018b).....	114
6 Diskussion.....	124
6.1 Die essentielle Bedeutung der Zilie und des TZ-Proteins Rpgr11 in der Entwicklung und Homöostase von Wirbeltieren.....	124
6.2 Die Funktion von Rpgr11 in der Zelltyp-spezifischen TZ-Assemblierung von Wirbeltieren	125
6.3 Die Funktion von Rpgr11 in der Regulation zellulärer Proteindegradationsprozesse	129
6.4 Die verschiedenen Funktionen von Rpgr11 und daraus resultierende Behandlungsstrategien für Ziliopathien	134
7 Literaturverzeichnis	137
8 Abkürzungen Und Einheiten	151
9 Danksagung	155
10 Eidesstattliche Erklärung	156

1 Zusammenfassung

Primäre Zilien stellen hochkonservierte Organellen dar, die auf nahezu jeder Zelle eines Wirbeltiers zu finden sind. Sie vermitteln eine Vielzahl an Signalwegen und sind daher von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase eines Lebewesens. Störungen der Zilienfunktion führen im Menschen zu verschiedenen Erkrankungen, die unter dem Begriff Ziliopathien zusammengefasst werden. Eine kurative Therapie für Ziliopathie-Patienten ist bis heute nicht verfügbar und daher wird aktuell nach den molekularen Mechanismen gesucht, die der Ausbildung einer Ziliopathie zu Grunde liegen. Oft wird eine Ziliopathie durch die Mutation eines Genes ausgelöst, welches für ein Protein der ziliären Transitionszone (TZ) kodiert. Die TZ stellt ein Kompartiment der Zilie dar und übt eine Torwächterfunktion aus, indem der ziliäre Import und Export von Proteinen reguliert wird. Ein Protein, das innerhalb der TZ eine besondere Funktion einnimmt, ist Rpgrip1l. Im Menschen führen *RPGRIP1L*-Mutationen zu lebensbedrohlichen Ziliopathien wie dem Joubert-Syndrom und dem Meckel-Gruber-Syndrom. Um eine Grundlage für die Therapie von Ziliopathien zu schaffen und die molekularen Mechanismen einer Ziliopathieausbildung zu entschlüsseln, wurden in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen Funktionen von Rpgrip1l an der Zilie untersucht. Hierzu wurden Analysen in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs), immortalisierten embryonalen Mausfibroblasten (NIH3T3), embryonalen Gliedmaßen, verschiedenen embryonalen Organen und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) durchgeführt. Neben der bereits bekannten Funktion von Rpgrip1l in der Regulation der proteasomalen Aktivität an der ziliären Basis, konnten mit Hilfe der vorliegenden Analysen zwei weitere Funktionen von Rpgrip1l aufgedeckt werden. So wird Autophagie unabhängig von der proteasomalen Aktivität positiv durch Rpgrip1l reguliert, indem Rpgrip1l die Aktivierung des Autophagie-Inhibitors mTorc1 verhindert. Folglich werden beide Hauptprozesse der zellulären Proteindegradation positiv von Rpgrip1l beeinflusst. Desweiteren zeigt sich übereinstimmend zu den in *C. elegans* gewonnenen Daten, dass Rpgrip1l in der TZ-Assemblierungshierarchie von Wirbeltieren eine übergeordnete Rolle spielt. Es stellt sich heraus, dass die TZ-Assemblierung in Vertebraten Zelltyp-spezifisch reguliert wird und eine Art Sicherheitsmechanismus besteht, bei dem die Integrität der TZ-Proteine nicht

nur durch Rpgrip1l allein, sondern durch ein Zusammenspiel von Rpgrip1l mit seinem Wirbeltier-spezifischen Homolog Rpgrip1 sichergestellt wird. Somit scheint die TZ-Assemblierung in Wirbeltieren auf komplexeren Mechanismen zu beruhen als die TZ-Assemblierung in wirbellosen Tieren. Neben den drei Hauptfunktionen von Rpgrip1l in der Entwicklung von Wirbeltieren, beschreibt die vorliegende Arbeit die Verbindung zwischen dem zilienassoziierten Hedgehog (Hh)-Signalweg und dem ziliären Proteasom, welches durch Rpgrip1l reguliert wird. Außerdem wird die Entstehung ventrikulärer Septendefekte (VSDs), die häufig als Symptom verschiedener Ziliopathien auftreten, als Folge einer gestörten Hh-Signalgebung erläutert. Abschließend wird diskutiert, dass Rpgrip1l neben den essentiellen Funktionen in der Entwicklung eines Organismus auch wichtige Funktionen innerhalb der Homöostase übernimmt. So gilt Rpgrip1l als Tumor-Suppressor, ist an der Zell-Migration und Proliferation beteiligt und in die Gewichtsregulation eines Organismus involviert. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass Rpgrip1l diese Prozesse durch das Proteasom und/oder die Autophagie reguliert. Falls einzelne Symptome oder gesamte Ziliopathie-Syndrome ebenfalls auf Störungen der hier aufgedeckten Funktionen von Rpgrip1l zurückgeführt werden können, würde die Aktivierung der proteasomalen und autophagischen Aktivität einen vielversprechenden Therapieansatz für Ziliopathie-Patienten darstellen.

2 Abstract

Primary cilia are highly conserved organelles that project from the surface of nearly every eukaryotic cell. They exert sensory functions and thereby play an essential role in embryonic development and adult tissue homeostasis. Disruption of ciliary functions leads to numerous severe human diseases summarised as ciliopathies. Until now, a curative medication against ciliopathies or ciliopathy-related defects is unknown. Therefore, a lot of effort is put into decoding the molecular mechanisms underlying the development of ciliopathies. The transition zone (TZ) is a subcompartment at the base of cilia and controls the ciliary import and export of proteins. Since many ciliopathies are based on mutations in genes encoding TZ proteins, a special focus is drawn on the functions of these proteins. In this regard Rpgrip1l seems to be of particularly importance for the functionality of the TZ. Patients which suffer from mutations in *RPGRIP1L* develop severe ciliopathies like the Joubert syndrome or the Meckel Gruber syndrome.

To elucidate possible therapy strategies against ciliopathies additional functions of Rpgrip1l were examined in this work. On that account, different cell types like mouse embryonic fibroblasts (MEFs), immortalised mouse embryonic fibroblasts (NIH3T3), mouse embryonic limb buds, several mouse embryonic organs and human embryonic kidney cells (HEK293) were used. Apart from the already known regulation of proteasomal activity at the ciliary base via Rpgrip1l, our data reveal two more functions of Rpgrip1l. Rpgrip1l positively regulates autophagic activity independently of proteasomal activity via Akt signaling and downregulation of mTorc1. Thus, the two main protein degradation systems in vertebrates are positively regulated by Rpgrip1l. Consistent with data obtained from *C. elegans*, Rpgrip1l plays a key role in vertebrate TZ assembly. In addition, our analyses demonstrate more complex TZ assembly mechanisms in vertebrates than in invertebrates. We describe a cell type-specific regulation whereby Rpgrip1l and its vertebrate specific homolog Rpgrip1 synergistically ensure the TZ protein composition in several vertebrate cell types. Beside these functions of Rpgrip1l in embryonic development, a regulation of Hh signaling via the cilia regulated proteasome and the development of ventricular septal defects (VSDs) due to a disrupted Hh signaling were

described. Furthermore, we discussed functions of Rpgrip1l in tissue homeostasis. Rpgrip1l is suggested to function as a tumor suppressor as well as a regulator of weight homeostasis, cell migration and cell proliferation. Interestingly these functions might be related to proteasomal and autophagic activity. If symptoms of ciliopathies are also caused by functional defects of these protein degradation processes, an activation of proteasomal activity and autophagic activity might be a promising therapeutic approach.

3 Einleitung

3.1 Die Zilie

Zilien sind kleine Zellfortsätze, die bereits 1677 im Rahmen der Entdeckung verschiedener Protozoa als kleine Beinchen oder Füße beschrieben wurden (Dobell, 1932; Leeuwenhoek, 1677). Erst über 100 Jahre später, nämlich 1786 und 1841, wurden die Bezeichnungen Cilium (Muller, 1786) und Flagellum (DuJardin, 1841) geprägt, welche in der Mitte des 19. Jahrhunderts vor allem folgendermaßen zu verstehen waren: Hatte eine Zelle einen oder wenige Fortsätze wurde dies durch den Begriff Flagellum beschrieben; waren viele Fortsätze auf einer Zelle zu beobachten wurde der Begriff Cilium verwendet (Bloodgood, 2009). In beiden Fällen wurde vornehmlich davon ausgegangen, dass die beobachteten Zilien und Flagellen der Bewegung des Organismus dienen und sonst keine Funktion ausüben. Im Jahr 1898 entdeckte Karl Wilhelm Zimmermann eine neue Art des Flagellums und beschrieb dieses als Zentral-Flagellum (Zimmermann, 1898). Grundlage hierfür war die Entdeckung des Zentrosoms, welches 1875 von Walther Flemming beschrieben wurde (Flemming, 1875). Zimmermann beobachtete, dass jede Epithelzelle ein besonderes Flagellum besitzt, welches an zwei Zentriolen gekoppelt ist. Er stellte zudem die Theorie auf, dass diese Zentral-Flagellen einer anderen Funktion als der Bewegung dienen und mutmaßte, dass sie eine sensorische Funktion ausüben könnten (Zimmermann, 1898). Nach diesen frühen und grundlegenden Entdeckungen im Bereich der Zilienbiologie wurde die Zilie für längere Zeit kaum beachtet, sodass es unter anderem zu einem Verlust spezifischer Bezeichnungen und dem damaligen Wissensstand kam. Durch die Entwicklung des Elektronenmikroskops im Jahr 1931 schließlich rückten Zilien wieder in den Fokus der Forschung (Fisch und Dupuis-Williams, 2011). Jedoch wurde gerade den Zentral-Flagellen, die nun als primäre, rudimentäre oder verkümmerte Zilien beschrieben wurden, wenig Beachtung geschenkt und ihre sensorische Funktion nicht registriert (Bernhard und deHarven, 1960; Sorokin, 1962; Sorokin, 1968). Erst nachdem menschlichen Erbkrankheiten Ziliendefekte als Ursache zugeordnet werden konnten, wurde man sich der Bedeutung der Zilien wieder bewusst (Afzelius, 1976). Nach und nach wurden

die Zilien unter Zuhilfenahme bestimmter Modellorganismen (*Chlamydomonas*, *C. elegans* und *Mus musculus*) detailliert charakterisiert. Vor allem in den letzten 20 Jahren konnten auf diese Weise immense Erfolge im Bereich der Zilienforschung verbucht werden, sodass die Definitionen und Funktionen der Zilien heute wie folgt beschrieben werden: Primäre Zilien sind unbewegliche Monozilien, die der Signalvermittlung dienen und damit für Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung von essentieller Bedeutung sind (Al-Bhalal und Akhtar, 2005; Pazour und Witman, 2003; Singla und Reiter, 2006). Motile Zilien sind bewegliche Zilien, die vor allem dem Transport von Stoffen dienen, jedoch direkt oder indirekt sensorische Funktionen übernehmen können (Andrade et al., 2005; Fernandes et al., 2008; Jennings, 1906; Lorenzo et al., 2008; Shah et al., 2009; Teilmann et al., 2005; Teilmann et al., 2006). Sie transportieren unter anderem Eizellen durch den Eileiter, Mucus durch die Trachea (Spassky und Meunier, 2017) und sind für die Spermienbewegung verantwortlich (Inaba und Mizuno, 2015). Zudem ist heute klar, dass sowohl primäre als auch motile Zilien hochkonservierte Organellen darstellen, die für die Entwicklung und Homöostase eines Organismus von essentieller Bedeutung sind (Carvalho-Santos et al., 2011; Gerdes et al., 2009; Pazour et al., 2000; Plotnikova et al., 2008).

3.1.1 Aufbau und Struktur der Zilie

Primäre und motile Zilien sind kleine Zytoplasmafortsätze der Zelle, die je nach Zelltyp eine Länge von 1 bis 20 μm und einen Durchmesser von circa 150 nm aufweisen. Grundlegend besitzen primäre und motile Zilien den gleichen Aufbau, lassen sich aber anhand spezifischer Merkmale voneinander unterscheiden. Zum grundlegenden Bauplan einer Zilie gehört der Basalkörper, die Transitionszone (TZ) und das Axonem (Abbildung 1). Der Basalkörper stellt den proximalen Part der Zilie dar. Er ist eine spezialisierte Mutterzentriole und gehört zusammen mit der rechtwinklig anliegenden Tochterzentriole zur initialen Struktur einer Zilie. Aufgrund der Funktion beider Zentriolen im Zellzyklus, wo sie während der Mitose die Spindelpole ausbilden (Nigg und Raff, 2009), ist die Ziliogenese strikt an die G_0 -Phase des Zellzyklus (Zellzyklus-Arrest) gekoppelt (Plotnikova et al., 2009). Der Basalkörper besteht aus

neun Mikrotubuli-Triplets, die jeweils aus einem A-, B- und C-Mikrotubulus aufgebaut sind („9x3“ Konformation) (Gibbons und Grimstone, 1960). Jedes der neun Mikrotubuli-Triplets ist am B-Tubulus über Transitionsfibrillen mit der Plasmamembran verbunden (Anderson, 1972). Diese Verbindungen verankern das distale Ende des Basalkörpers in der Zellmembran und stellen dort eine Grenze zwischen der Plasmamembran und der ziliären Membran dar. Der Grenzbereich wird hier auch als periziliäre Membran beschrieben. Neben der Abgrenzung von Plasmamembran und ziliärer Membran, fungieren die Transitionsfibrillen als Andockstelle für Partikel des Intra-Flagellaren-Transports (IFT) (Deane et al., 2001; Williams et al., 2011). Der IFT ist ein ziliäres Transportsystem, welches in zwei Richtungen funktioniert und Multiproteinkomplexe entlang von Mikrotubuli befördert. Der Cargo kann entweder von der ziliären Basis zur Spitze (anterograd) oder von der ziliären Spitze zur Basis (retrograd) transportiert werden (Ishikawa und Marshall, 2017). Für den anterograden Transport werden IFT-Partikel des Subkomplexes B (IFT-B) sowie Kinesin-2 benötigt. Der retrograde Transport ist Dynein-2 getrieben und basiert auf IFT-Proteinen des Komplexes A (IFT-A) (Iomini et al., 2001; Lucker et al., 2005; Scholey, 2008). Generell werden Moleküle mit einem Molekulargewicht <10 kDa nicht vom IFT transportiert, da sie frei vom Zytoplasma der Zelle in die Zilie diffundieren können. Größere Moleküle (>10 kDa) hingegen benötigen den IFT für ihren Transport durch die Zilie (Rosenbaum und Witman, 2002). Damit ist der IFT entscheidend am Auf- und Abbau sowie der Funktionalität der Zilien beteiligt (Cole, 2003; Hou et al., 2004; Pazour und Rosenbaum, 2002; Pedersen et al., 2008; Rosenbaum und Witman, 2002). Der Aufbau der Zilien beinhaltet zusätzlich zur Verankerung des Basalkörpers in der Plasmamembran den Aufbau des Axonems. Dieses entsteht aus dem Basalkörper und ist das stabilisierende Gerüst der Zilie. Das Axonem primärer Zilien besteht aus neun Mikrotubuli-Dupletts (A- und B-Tubulus), die aus den Mikrotubuli-Triplets des Basalkörpers hervorgehen und radiärsymmetrisch angeordnet sind („9+0“-Konformation) (Anderson, 1972). Bei motilen Zilien findet sich zusätzlich zu den neun kreisförmig angeordneten Dupletts ein zentrales Mikrotubuli-Paar („9+2“-Konformation) (De Robertis, 1956). Außerdem sind hier Strukturen wie Nexin-„Linker“, Dynein-Arme und Radialspeichen zu finden, die für die Bewegung der motilen

Zilien essentiell sind (Abbildung 1). Umgeben wird das Axonem von der ziliären Membran, die sich anhand ihrer molekularen Zusammensetzung klar von der Plasmamembran unterscheidet. Neben spezifischen Phosphatanreicherungen zeichnet sich vor allem die Membran primärer Zilien durch die Konzentration vieler Signalweg-Rezeptoren aus (Chávez et al., 2015; Garcia-Gonzalo et al., 2015; Rohatgi und Snell, 2010). An der ziliären Basis bildet die Membran häufig eine Einstülpung, die als ziliäre Tasche („ciliary pocket“) bezeichnet wird (Molla-Herman et al., 2010) und der Fusion intrazellulärer Vesikel mit der ziliären Membran dient (Nachury et al., 2010). Im Bereich der ziliären Tasche, am proximalen Ende des Axonems und distal des Basalkörpers, liegt die TZ, die für die Funktion einer Zilie von besonderer Bedeutung ist.

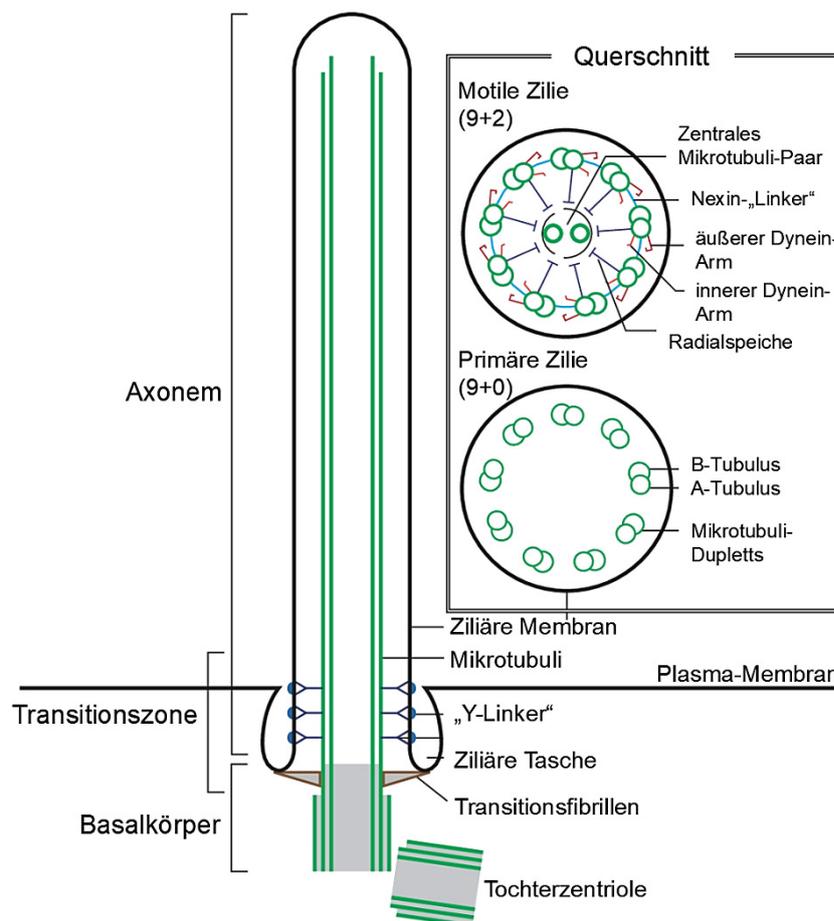


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Zilie

Die Zilie besteht aus einem Basalkörper, der Transitionszone (TZ) und dem Axonem. Der Basalkörper ist eine spezialisierte Mutterzentriole und verankert die Zilie über Transitionsfibrillen in der Plasmamembran der Zelle. Aus dem Basalkörper wächst das Axonem heraus, welches der Zilie Stabilität verleiht. Das Axonem besteht aus radiärsymmetrisch angeordneten Mikrotubuli-Dupletts.

Diese weisen bei motilen Zilien eine „9+2“- und bei primären Zilien eine „9+0“-Konformation auf. Das Axonem ist von der ziliären Membran umgeben. Der proximale Bereich des Axonems, der an den Basalkörper grenzt, wird als TZ bezeichnet. Die TZ zeichnet sich durch „Y-Linker“ aus. Außerdem ist im Bereich der TZ die ziliäre Tasche lokalisiert, welche eine Einstülpung der Membran darstellt. Modifiziert nach Ishikawa und Marshall (Ishikawa und Marshall, 2017).

3.1.2 Die ziliäre Transitionszone

Die ziliäre Transitionszone (TZ) ist ein Kompartiment der Zilie, welches sich durch spezifische Strukturen und Funktionen auszeichnet. Sowohl primäre als auch motile Zilien bilden Transitionszonen aus (Avidor-Reiss und Leroux, 2015). Da in der vorliegenden Arbeit und den dazugehörigen Publikationen ausschließlich primäre Zilien thematisiert werden, wird der Fokus im Folgenden auf diese gelegt.

Die TZ entsteht am distalen Ende des Basalkörpers, welches durch die Ausbildung der Transitionsfibrillen markiert wird. Die Transitionsfibrillen entspringen den B-Tubuli der basalen Mikrotubuli-Triplets (siehe 3.1.1) in der Region, in der die C-Tubuli des Basalkörpers terminiert werden (Anderson, 1972). Sie stellen die proximale Begrenzung der TZ dar und so entspricht das Mikrotubuli-Grundgerüst der TZ der „9+0“-Konformation des Axonems (siehe 3.1.1) (Abbildung 2). Distal der Transitionsfibrillen ist die TZ durch mehrere Reihen so genannter „Y-Linker“ gekennzeichnet (Abbildung 2). Diese Verbinden die Mikrotubuli-Duplets mit der ziliären Membran und sind im Elektronenmikroskop als verdichtetes Y-förmiges Material zu erkennen (Gibbons und Grimstone, 1960). Zusätzlich sind spezifische Membran-Partikel, die im Bereich der „Y-Linker“ liegen, charakteristisch für die TZ. Die Partikel bilden Ringe innerhalb der ziliären Membran und werden daher auch als „ciliary necklace“ bezeichnet (Gilula und Satir, 1972).

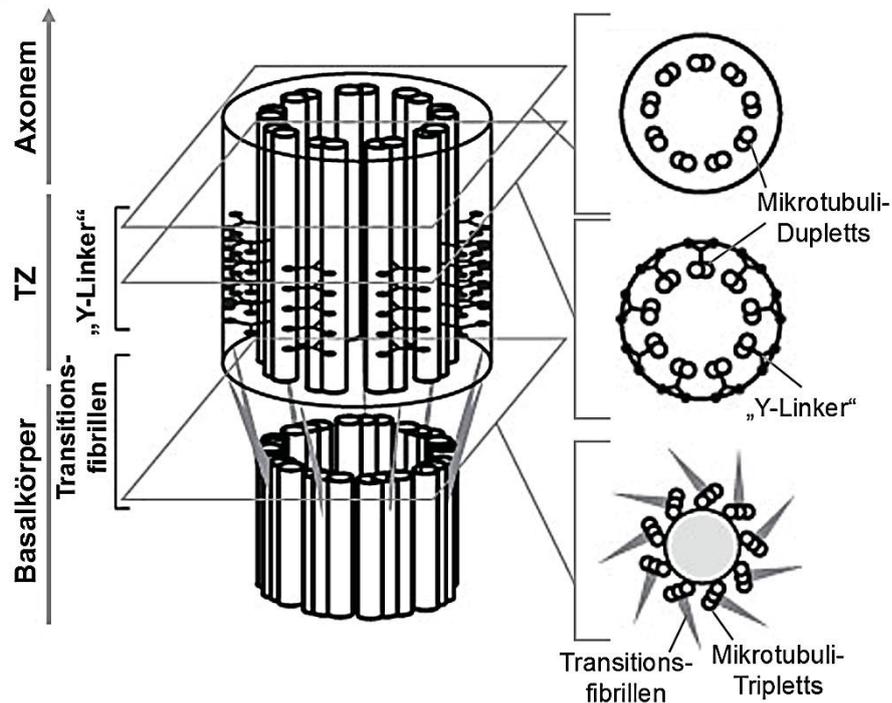


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Transitionszone (TZ) einer primären Zilie

Die TZ liegt distal vom Basalkörper im proximalen Bereich des Axonems und ist durch die Präsenz der „Y-Linker“ gekennzeichnet. Die Transitionsfibrillen, die den distalen Bereich des Basalkörpers in der Plasmamembran verankern, stellen die proximale Begrenzung der TZ dar. Das Grundgerüst der TZ entspricht einer „9+0“-Mikrotubuli-Konformation. Modifiziert nach Czarnecki und Shah (Czarnecki und Shah, 2012).

Bisher ist noch weitgehend unbekannt, aus welchen Proteinen die „Y-Linker“ oder die spezifischen Membran-Partikel der TZ zusammengesetzt sind. Da es jedoch eine Vielzahl von Proteinen gibt, die eine spezifische Lokalisation und Funktion in der ziliären TZ aufweisen, wird vermutet, dass die „Y-Linker“ und Membran-Partikel aus ebendiesen Proteinen bestehen. Mit Hilfe verschiedenster Lokalisations- und Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen bestimmten TZ-Proteinen und dem Aufbau ziliärer Ultrastrukturen besteht (Shi et al., 2017). Auch die Abhängigkeit verschiedener TZ-Proteine voneinander, sowie die Interaktion einiger TZ-Proteine mit IFT-Komponenten, konnte nachgewiesen werden (Chih et al., 2011; Craige et al., 2010; Dawe et al., 2007; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Gorden et al., 2008; Jauregui et al., 2008; Pazour et al., 2005; Sang et al., 2011; Shi et al., 2017; Williams et al., 2011; Zhao und Malicki, 2011). Neben dem Aufbau der TZ erfüllen die TZ-

Proteine eine wichtige Funktion als ziliärer Torwächter. Zusammen mit den Transitionsfibrillen kontrolliert die TZ den ziliären Import und Export von Proteinen und ist von essentieller Bedeutung für die Ziliogenese und ziliäre Funktion (Benzing und Schermer, 2011; Betleja und Cole, 2010; Chih et al., 2011; Craige et al., 2010; Czarnecki und Shah, 2012; Deane et al., 2001; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Omran, 2010; Reiter et al., 2012; Williams et al., 2011).

3.1.3 Die Transitionszonen-Assemblierungshierarchie

Um die Funktion der TZ als Torwächter zu erfüllen, bilden die TZ-Proteine ein Netzwerk aus. Dieses Netzwerk der interagierenden TZ-Proteine ist noch nicht komplett entschlüsselt, jedoch konnte mit Hilfe von Studien in *C. elegans* ein Modell erstellt werden, in dem die TZ-Proteine in verschiedene Multiprotein-Komplexe eingeordnet werden (Czarnecki und Shah, 2012; Sang et al., 2011; Williams et al., 2011). So lassen sich vier miteinander interagierende Module unterscheiden: Das Nphp1-4-8-Modul, das Nphp5-6-Modul, das Inversin (Invs)-Kompartiment und das Mks/B9-Modul (Sang et al., 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Aufbau der TZ einer klaren Hierarchie unterliegt. Diese wird als TZ-Assemblierungshierarchie beschrieben (Sang et al., 2011; Williams et al., 2011). Demzufolge steht Rpgr11 (alias Nphp8), eine Komponente des Nphp1-4-8-Moduls, an der Spitze dieser Hierarchie. Die TZ-Lokalisationen von Nphp4, Cep290 (alias Nphp6) und Invs (alias Nphp2) sind von Rpgr11 abhängig (Jensen et al., 2015; Li et al., 2016; Williams et al., 2011). Damit beeinflusst Rpgr11 sowohl Mitglieder des eigenen Moduls, als auch Mitglieder des Nphp5-6-Moduls und des Invs-Kompartiments (Abbildung 3). Nphp1 wiederum wird von Nphp4 beeinflusst (Mollet et al., 2002). Folglich steuert Rpgr11 die Nphp1-Lokalisation an der TZ indirekt durch Nphp4. Auch für die Lokalisation der Komponenten des Mks/B9-Moduls ist Rpgr11 verantwortlich, da es diese über Cep290 reguliert. Cep290 als Mitglied des Nphp5-6-Moduls ist in *C. elegans* dem Mks/B9-Modul übergeordnet und für deren Lokalisation von essentieller Bedeutung. Andere TZ-Module werden allerdings nicht von Cep290 beeinflusst (Li et al., 2016; Sang et al., 2011; Williams et al., 2011) (Abbildung 3). Neben den Studien zur TZ-Assemblierungshierarchie in *C. elegans* wurden auch Analysen in *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Hier zeigt sich im

Bezug auf Cep290 ein identisches Bild (Basiri et al., 2014; Jana et al., 2018). Da in *Drosophila melanogaster* kein Nphp1-4-8-Modul vorhanden ist (Vieillard et al., 2016), lassen sich durch diese Analysen nur bedingt Rückschlüsse auf eine generelle TZ-Assemblierungshierarchie ziehen. Ein weiterer Nachteil der Fruchtfliege ist, dass ihre Entwicklung größtenteils Zilien-unabhängig verläuft und nur wenige Zelltypen überhaupt Zilien ausbilden (Basto et al., 2006; Pratt et al., 2016). Dies gilt ebenso für den Modellorganismus *C. elegans* (Apfeld und Kenyon, 1999; Bae und Barr, 2008; Inglis et al., 2007).

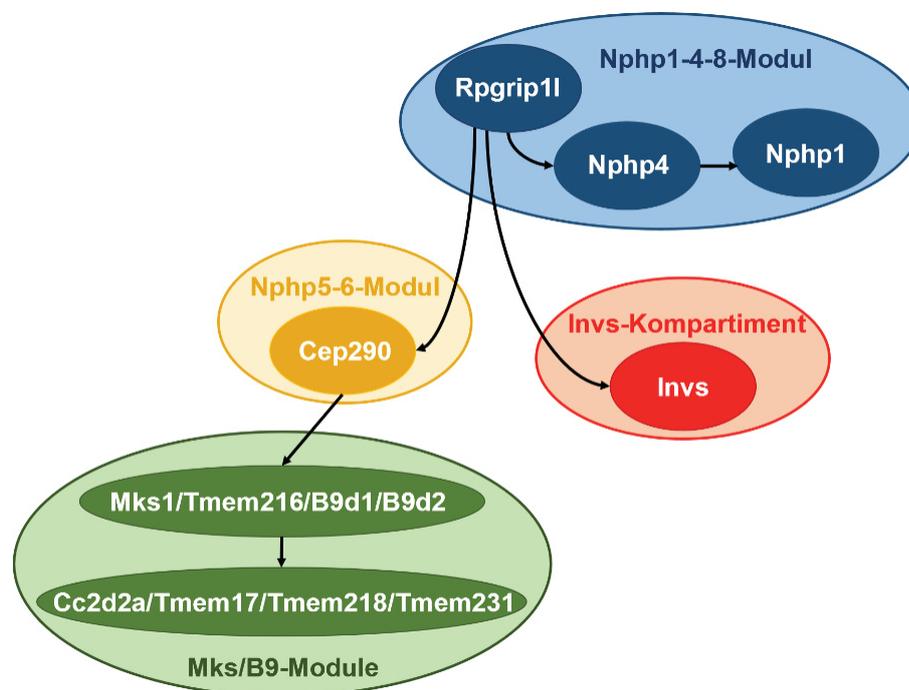


Abbildung 3: Die Transitionszonen-Assemblierungshierarchie in *C. elegans*

Schematische Darstellung der TZ-Assemblierungshierarchie in *C. elegans*. Dargestellt ist das Nphp1-4-8-Modul mit den Mitgliedern Rpgrip1I, Nphp4 und Nphp1 in blau. Das Nphp5-6-Modul mit Cep290 ist in gelb abgebildet. Das Invs-Kompartiment mit Invs ist in rot gezeigt und in grün sind das Mks/B9-Modul und dessen Vertreter dargestellt. Rpgrip1I steht an der Spitze der TZ-Assemblierungshierarchie. Sowohl Mitglieder des Nphp1-4-8-Moduls, als auch Cep290 und Invs benötigen Rpgrip1I um an der TZ zu akkumulieren. Das Mks/B9-Modul hängt ebenfalls von Rpgrip1I ab, da es indirekt durch Cep290 reguliert wird.

Da Zilien in der Entwicklung von Wirbeltieren von essentieller Bedeutung sind, in *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* jedoch nicht zwangsläufig benötigt werden, stellt sich die Frage, ob die in *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* gewonnenen Erkenntnisse über die TZ-Assemblierungshierarchie auf Wirbeltiere übertragbar sind. Hierzu wurden initiale Studien in

Geweben der Hausmaus (*Mus musculus*) und in menschlichen Zellen (humane Fibroblasten) durchgeführt. Diese weisen darauf hin, dass sich das Modell der TZ-Assemblierungshierarchie von *C. elegans* auf Wirbeltiere übertragen lässt (Huang et al., 2011; Shi et al., 2017).

3.1.4 Der Zilien-assoziierte Hedgehog-Signalweg

Durch die Lokalisation unterschiedlicher Rezeptoren in der ziliären Membran, kann eine Vielzahl von Signalwegen über die Zilie vermittelt werden. Das macht Zilien zu wichtigen Regulatoren zellulärer Prozesse (Christensen et al., 2007; Eggenschwiler und Anderson, 2007; Goetz und Anderson, 2010; Satir et al., 2010). So werden zum Beispiel der Pdgfra-, der kanonische sowie nicht-kanonische Wnt-, der Tgf β - und der Hedgehog (Hh)-Signalweg durch Zilien vermittelt (Corbit et al., 2005; He, 2008; Ocbina et al., 2009; Rohatgi et al., 2007; Schneider et al., 2005). Zu den am besten beschriebenen gehört dabei der Hh-Signalweg. Dieser liegt hochkonserviert vor und ist für die Entwicklung zahlreicher Organe von essentieller Bedeutung (Bangs und Anderson, 2017; Briscoe und Thérond, 2013; Ingham und McMahon, 2001; Ingham et al., 2011; Lee et al., 2016; Sasai und Briscoe, 2012; Tasouri und Tucker, 2011). Ursprünglich wurde der Hh-Signalweg in *Drosophila melanogaster* beschrieben, wo der Verlust des Liganden Hedgehog zu igelähnlichen Larven-Phänotypen führt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). In Wirbeltieren wird unter anderem die Ausbildung der Körperachsen und die Entwicklung des zentralen Nervensystems vom Hh-Signalweg beeinflusst (Astorga und Carlsson, 2007; Chiang et al., 1996; Ericson et al., 1997; Hatton et al., 2006; Meyer und Roelink, 2003; Pagán-Westphal und Tabin, 1998; Schilling et al., 1999; Sillitoe und Joyner, 2007; Treier et al., 1998; Watanabe und Nakamura, 2000; Zhang et al., 2001). Störungen des Hh-Signalwegs führen zu schwerwiegenden Erkrankungen wie dem Greig-Cephalopolysyndaktylie-Syndrom (GCPS), dem Pallister-Hall-Syndrom (PHS), dem Gorlin-Syndrom oder einer Holoprosenzephalie und Zyklopie (Mullor et al., 2002).

Als Ligand des Hh-Signalwegs können in Wirbeltieren drei Sekretionsproteine der Hh-Proteinfamilie dienen: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) (Echelard et al., 1993). Ist kein Ligand vorhanden, lokalisiert der Rezeptor Patched 1

(Ptc1), der ein 12-Transmembranprotein darstellt, in der ziliären Membran (Rohatgi et al., 2007). Hier inhibiert er den ziliären Eintritt des 7-Transmembranproteins Smoothened (Smo). Dieses verbleibt daraufhin in Vesikeln innerhalb der Zelle und kann nicht auf die „GLI family zinc finger“ (Gli)-Proteine wirken (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007) (Abbildung 4). Die Familie der Gli-Proteine umfasst die Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3, wobei Gli2 und Gli3 als Mediatoren des Hh-Signalwegs dienen (Bai et al., 2002; Dai et al., 1999; Ding et al., 1998). In Abwesenheit des Hh-Liganden liegen die Vollängenformen von Gli2 und Gli3 (Gli2-FL und Gli3-FL) in einem Komplex mit Fused und Suppressor of Fused (Sufu) vor (Abbildung 4). Durch diesen Komplex unterstützt, werden Gli2-FL und Gli3-FL proteolytisch zu Repressorformen prozessiert (Gli2-R und Gli3-R). Die proteolytische Prozessierung wird hierbei an der Basis der Zilie durch das Proteasom realisiert (Gerhardt et al., 2015; Schrader et al., 2011; Wang et al., 2000). Die Repressorformen translozieren in den Zellkern und inhibieren dort die Hh-Zielgenexpression, wobei Gli3-R eine stärkere Repressorfunktion ausübt als Gli2-R (Wang et al., 2000). Ist ein Hh-Ligand vorhanden, bindet dieser an Ptc1 (Kayed et al., 2003; Stone et al., 1996; Yao et al., 2002). Der Hh/Ptc1-Komplex verlässt daraufhin die Zilie und Smo wird nicht mehr inhibiert (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). Smo transloziert in die ziliäre Membran und wirkt dort auf den Komplex aus Gli2-FL, Gli3-FL, Fused und Sufu. Die Gli-Proteine dissoziieren aus dem Komplex und können aktiviert werden (Gli2-A und Gli3-A) (Chen et al., 2009; Humke et al., 2010) (Abbildung 4). Die Transkriptionsaktivatoren Gli2-A und Gli3-A gelangen in den Zellkern und schalten dort die Hh-Zielgenexpression an, durch die zahlreiche zelluläre Prozesse gesteuert werden.

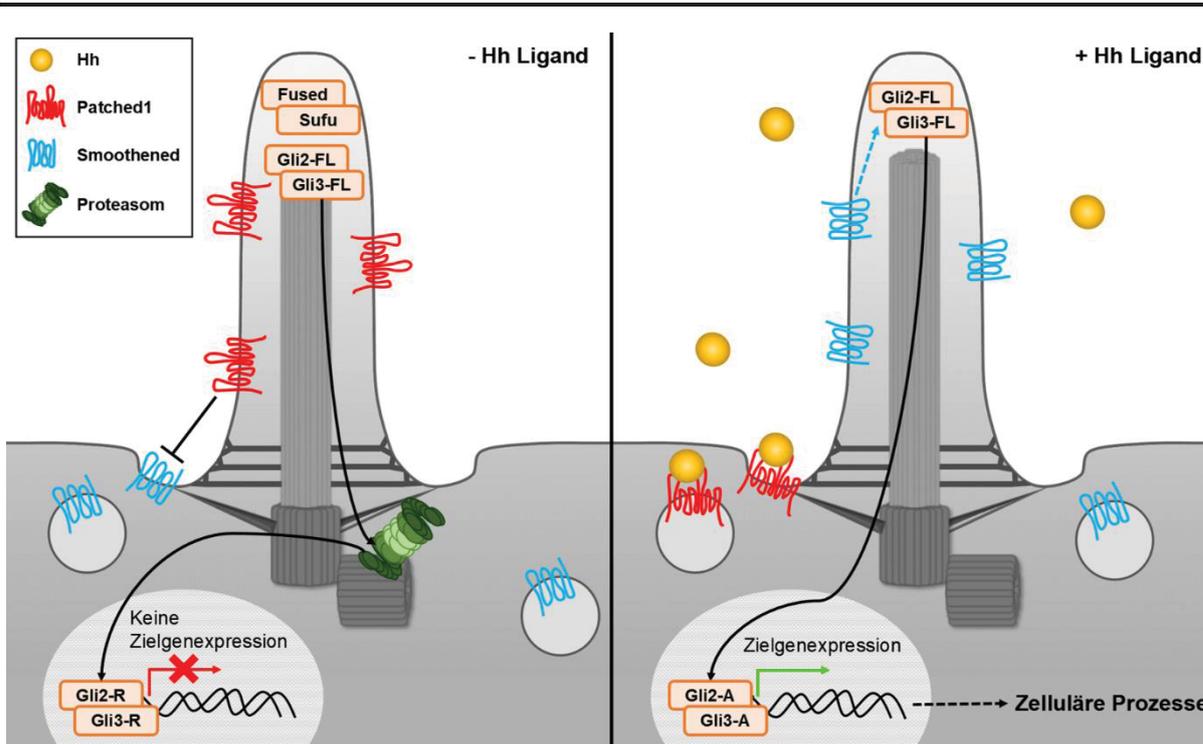


Abbildung 4: Der Hedgehog-Signalweg

Ohne den Liganden Hh ist der Rezeptor Ptc1 in der ziliären Membran lokalisiert und inhibiert das Transmembranprotein Smo. Dadurch können Gli2-FL und Gli3-FL mit Hilfe von Fused und Sufu vom Proteasom prozessiert werden. Gli2-R und Gli3-R translozieren in den Zellkern und inhibieren die Hh-Zielgenexpression. Ist Hh vorhanden bindet dieses an Ptc1. Durch die Bindung verlässt Ptc1 die ziliäre Membran und Smo wird nicht weiter inhibiert. Smo diffundiert in die ziliäre Membran und bewirkt dort die Freisetzung der Gli-Vollängenproteine von Fused und Sufu. Dadurch können Gli2-FL und Gli3-FL aktiviert werden. Gli2-A und Gli3-A translozieren in den Zellkern und schalten dort die Hh-Zielgenexpression an, durch die zahlreiche zelluläre Prozesse gesteuert werden.

3.2 Ziliopathien

Da Zilien mit ihrer signalvermittelnden Funktion von herausragender Bedeutung für die Entwicklung und das Überleben eines Organismus sind, führen Defekte der Zilienstruktur oder Zilienfunktion zu schwerwiegenden Erkrankungen. Diese werden als Ziliopathien bezeichnet und können ein breites Spektrum an Symptomen aufweisen. Die erste Krankheit, die als Ziliopathie charakterisiert wurde, ist das Kartagener-Syndrom, welches eine Primäre Ziliäre Dyskinesie (PCD) mit zusätzlichem *Situs inversus* darstellt (Afzelius, 1976; Kartagener, 1933). Generell sind Ziliopathien in ihrer Ausprägung variabel, durch das Auftreten bestimmter Symptom-Kombinationen lassen sie sich aber in verschiedene Syndrome einteilen. Zu den bekanntesten Syndromen, deren Ursache in dysfunktionalen Zilien liegt, zählen das Meckel-

Gruber-Syndrom (MKS), das Joubert-Syndrom (JBTS), das COACH-Syndrom, das Senior-Løken-Syndrom (SLS), das Alström-Syndrom, das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS), das Oro-fazio-digitale Syndrom (OFD) und das Ellis van Creveld-Syndrom (EVC). Desweiteren können Krankheiten wie eine Nephronophthise (NPHP), Polyzystische Nierenerkrankung (PKD) und Lebersche Kongenitale Amaurose (LCA) in Folge einer Ziliendysfunktion ausgebildet werden (Czarnecki und Shah, 2012; Hildebrandt et al., 2009; Lee und Gleeson, 2010; Ware et al., 2011; Waters und Beales, 2011). Verschiedene Mutationen desselben Gens können zur Manifestation unterschiedlicher Syndrome führen, wobei einige Symptome der einzelnen Syndrome überlappen (Sang et al., 2011). Typische Ziliopathiedefekte in Patienten sind Zystenbildung in Niere und Leber, Respirationsdefekte, Polydaktylie, Infertilität, Lateralitätsdefekte, Herzfehler, Sehbehinderungen und verschiedene Defekte des zentralen Nervensystems (Fliegau et al., 2007; Mitchison und Valente, 2017). Je nach Syndrom und Manifestationsgrad liegen unterschiedliche Überlebensraten für Ziliopathiepatienten vor. So können Patienten mit Alström-Syndrom das Erwachsenenalter erreichen, wohingegen bei MKS-Patienten eine prä- oder perinatale Letalität vorliegt (Álvarez-Satta et al., 2015; Hildebrandt et al., 2011; Waters und Beales, 2011). Insgesamt werden Ziliopathien zu den seltenen Erkrankungen gezählt, da nach aktuellem Stand nur einer von eintausend Menschen betroffen ist (www.ciliopathyalliance.org). Da jedoch bei immer mehr Krankheiten, wie zum Beispiel verschiedenen Tumorerkrankungen, ein Ziliendefekt als Ursache vermutet wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass Ziliopathien ihren Status als seltene Erkrankung verlieren und stärker in den Fokus der biomedizinischen Forschung rücken (Castresana, 2015; Reiter und Leroux, 2017). Hier wird aktuell nach den molekularen Mechanismen gesucht, die der Ausbildung einer Ziliopathie zu Grunde liegen. Mit Hilfe dieser Mechanismen wird versucht eine kurative Therapie für Ziliopathien zu entwickeln. Besonderer Fokus wird hierbei auf das Verständnis der Formations- und Funktionsmechanismen der TZ gelegt, da dort besonders viele Proteine akkumulieren, deren Mutationen zu Ziliopathien führen (Czarnecki und Shah, 2012; Hildebrandt et al., 2011).

3.3 Das Transitionszonenprotein Rpgrip1l

Durch eine Insertions-Mutagenese in der Maus, die zur Deletion einer 1.6 Mb großen Region auf dem achten Chromosom führte, wurde die *Fused toes (Ft)* Mutante generiert. Der Name *Ft* wurde aufgrund des Phänotyps heterozygoter Tiere gegeben, die eine Syndaktylie der Vordergliedmaßen zeigen (van der Hoeven et al., 1994). Homozygot mutante *Ft*-Tiere weisen schwere Hirndefekte sowie eine gestörte Links-Rechts-Asymmetrie auf und sterben spätestens am Embryonaltag (E) 10 (Peters et al., 2002; van der Hoeven et al., 1994). Von der Deletion, die in *Ft*-Mutanten vorliegt, sind 6 Gene betroffen. Neben den drei bekannten Genen des *Iroquois (Irx) B Clusters*, zu dem *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* zählen (Peters et al., 2000), wurden drei neue Gene identifiziert. Um diese zu charakterisieren, wurden Mausmutanten für jedes dieser Gene generiert. Neben den Mutanten *Fto (Fatso; später Fat mass and obesity associated)* und *Ft1 (Fused toes 1; später Fts)*, die im Vergleich zu den *Ft*-Mutanten einen schwachen mutanten Phänotyp zeigen (Fischer et al., 2009; La Torre et al., 2018), weist die *Ftm*-Mutante (*Fantom; später Rpgrip1l*) einen starken mutanten Phänotyp auf. Homozygot mutante Tiere bilden Defekte in zahlreichen Organen aus und sterben spätestens bei der Geburt (Vierkotten et al., 2007). So führt eine *Ftm*-Defizienz zu schwerwiegenden Hirndefekten, wie dem Verlust des Riechkolbens und der Rathke-Tasche, Malformationen des Corpus-Callosum und zu Telenzephalon-Defekten. Auch eine Exenzephalie kann auftreten. Außerdem können Augendefekte wie eine Mikrophthalmie oder Anophthalmie ausgebildet werden. Desweiteren weisen *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine präaxiale Polydaktylie mit einer zusätzlichen Zehe, sowie cranio-fasziale Deformationen auf. Auch Leber- und Nierenzysten und eine gestörte Lungenentwicklung sind unter *Ftm*-Verlust zu beobachten (Besse et al., 2011; Delous et al., 2007; Laclef et al., 2015; Vierkotten et al., 2007). In *Ftm*-negativen Embryonen kann die Links-Rechts-Asymmetrie gestört sein und es können verdünnte Herzwände und ventrikuläre Septendefekte (VSD) auftreten (Gerhardt et al., 2013; Vierkotten et al., 2007). Zusätzlich ist die Morphogenese der Haar-Follikel in *Ftm*^{-/-}-Embryonen gestört (Chen et al., 2015). Heterozygot mutante *Ftm*-Tiere hingegen weisen embryonal keine Defekte auf (Vierkotten et al., 2007). Interessanterweise entsprechen die Defekte der homozygot

mutanten *Ftm*-Embryonen den Symptomen einer Ziliopathie (siehe 3.2) und tatsächlich konnte in verschiedenen Ziliopathiepatienten eine *FTM*-Mutation als Ursache nachgewiesen werden. So weisen sowohl Patienten mit MKS, JBTS, NPHP als auch COACH-Syndrom Mutationen in *FTM* auf (Arts et al., 2007; Delous et al., 2007; Doherty et al., 2010; Wolf et al., 2007). Neben der Bezeichnung *FTM* sind auch die Begriffe *RPGRIP1L*, *MKS5*, *JBTS7*, *CORS3* und *NPHP8* zu finden. Als offizieller Name für das *FTM*-Gen wurde *RPGRIP1L* (*Retinis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1 Like*) festgelegt. *RPGRIP1L* ist ein hoch konserviertes Gen, welches auf dem Chromosom 16 liegt und für ein Protein mit 1315 Aminosäuren kodiert. Dieses Protein bildet N-terminal 7 coiled-coil-Domänen (CC) und C-terminal drei C2-Domänen aus, wobei die terminalste C2-Domäne einer Rpgrip-Interaktionsdomäne (RID C2) entspricht. Die RID C2 wurde ebenfalls in Rpgrip1 (*Retinis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1*), einem Wirbeltier-spezifischen Homolog von Rpgrip1l, nachgewiesen (Boylan und Wright, 2000; Hong et al., 2001). Um die Funktionen von Rpgrip1l genauer zu untersuchen, wurden zunächst Lokalisationsanalysen durchgeführt. Rpgrip1l lokalisiert während der Zellteilung an den Zentrosomen und akkumuliert während der G₁- oder G₀-Phase des Zellzyklus in der ziliären TZ (Delous et al., 2007; Gerhardt et al., 2015; Vierkotten et al., 2007). Die Lokalisation von Rpgrip1l in der TZ wird hierbei über die CC-Domänen realisiert (Jensen et al., 2015). Innerhalb der TZ-Assemblierung übernimmt Rpgrip1l eine zentrale Funktion und ist somit von enormer Bedeutung für die Funktion der TZ als ziliärer Torwächter (siehe 3.1.3). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Rpgrip1l für eine Art ziliäre Sperrzone („ciliary zone of exclusion“, CIZE) verantwortlich ist, die distal der TZ liegt. Mit Hilfe der CIZE wird die ziliäre Akkumulation von Proteinen wie Invs limitiert. In Rpgrip1l-negativen Zellen oder Geweben liegen Zilien in ihrer Länge verändert vor (Gerhardt et al., 2015), was auf eine gestörte Zilienfunktion hindeutet (Cui et al., 2011; Dowdle et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Ishikawa und Marshall, 2011; Larkins et al., 2011). Tatsächlich konnte anhand der Hh-Signalgebung gezeigt werden, dass *Rpgrip1l*-negative Zilien eine reduzierte Funktionalität aufweisen und Rpgrip1l somit von essentieller Bedeutung für die Zilienfunktion ist (Besse et al., 2011; Gerhardt et al., 2013; Vierkotten et al., 2007). Neben der Lokalisation und Bedeutung

für die Funktionalität der Zilie konnte durch Interaktionsstudien gezeigt werden, dass Rpgrip1l durch seine C2-Domänen mit Nphp4, Myosin Va und der Serin/Threonin Kinase Nek4 interagiert (Arts et al., 2007; Assis et al., 2017; Coene et al., 2011; Delous et al., 2007). Desweiteren konnte eine Interaktion der RID C2 von Rpgrip1l mit der Proteasomenuntereinheit Psmd2 nachgewiesen werden, durch die Rpgrip1l in der Lage ist die proteasomale Aktivität an der ziliären Basis zu regulieren (Gerhardt et al., 2015) (siehe 3.4.1). Mit Hilfe zusätzlicher *in vitro* Studien wurde eine Verbindung zwischen Rpgrip1l und dem Zellzyklus nachgewiesen, bei der Rpgrip1l das mitotische Kontrollpunktprotein Mad2 reguliert (Lin et al., 2009). Daher wird auch vermutet, dass Rpgrip1l als Tumorsuppressor fungiert (Gerhardt et al., 2016a; Lin et al., 2009). Desweiteren konnten Untersuchungen in der Zellkultur zeigen, dass Rpgrip1l an der Ziliogenese beteiligt ist und diese eventuell durch Myosin Va steuert (Assis et al., 2017). Auch die Interaktion von Rpgrip1l mit Nek4 steht im Zusammenhang mit der Funktion von Rpgrip1l für die Ausbildung der Zilie. Nek4 und sein zugehöriges Signalnetzwerk spielen eine wichtige Rolle für die Ziliogenese und werden von Rpgrip1l und Rpgrip1 an die Zilie beordert (Coene et al., 2011). Desweiteren beeinflusst Rpgrip1l über die Funktionalität der Zilie die Leptin-Signalgebung. Bei einer Reduktion von Rpgrip1l kommt es in adulten *Rpgrip1^{+/−}*-Mäusen zur Ausbildung von Fettleibigkeit (Stratigopoulos et al., 2016; Stratigopoulos et al., 2011; Stratigopoulos et al., 2014). Ob hierbei ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Funktionen von Rpgrip1l besteht, muss durch zukünftige Untersuchungen aufgedeckt werden.

3.4 Mechanismen der Proteindegradation in Wirbeltieren

In Wirbeltieren gibt es verschiedene Möglichkeiten der Proteindegradation. Neben extrazellulären Mechanismen wie der enzymatischen Verdauung von Nahrungsbestandteilen im Darm, sind die intrazellulären Mechanismen der Proteindegradation von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase eines Organismus. In eukaryotischen Zellen sind für die intrazelluläre Proteindegradation hauptsächlich zwei Prozesse verantwortlich. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie (Dikic, 2017; Lilienbaum, 2013). Die

zwei Degradations-Mechanismen interagieren miteinander und wirken dabei in entgegengesetzte Richtungen: Ist ein Degradationsprozess in seiner Aktivität reduziert, ist die Aktivität des anderen Mechanismus erhöht (Levine und Kroemer, 2008; Lilienbaum, 2013). Generell ist das UPS für den Großteil des Proteinabbaus zuständig (80-90%) (Rock et al., 1994), wohingegen Autophagie vor allem für den Abbau langlebiger Proteine, Proteinaggregate oder Zellorganellen verantwortlich ist (Yang und Klionsky, 2010). Indem nicht benötigte oder geschädigte Proteine abgebaut werden, werden die Zellen vor einem Proteinüberschuss geschützt. Dieser würde andernfalls zu Störungen verschiedener zellulärer Funktionen führen. So sind zum Beispiel neurodegenerative Erkrankungen mit der Akkumulation fehlerhafter Proteine assoziiert (Ciechanover und Brundin, 2003). Außerdem werden beim Proteinabbau durch das UPS und die Autophagie Aminosäuren recycelt, was für die Zelle eine Einsparung von Energie bedeutet (Lilienbaum, 2013). Auch in die intrazelluläre Signalgebung und Signalweiterleitung sind die Degradationsprozesse involviert, da Signalmoleküle abgebaut werden müssen, um eine permanente Signalgebung zu verhindern (Hamacher-Brady, 2012; Liu et al., 2012; Wickliffe et al., 2009). Desweiteren ist das Proteasom in der Lage bestimmte Proteine eines Signalweges zu prozessieren und dadurch die Signaltransduktion zu regulieren (Schubert et al., 2000).

3.4.1 Proteasomale Degradation und Rpgrip11

Die Ubiquitin-abhängige proteasomale Proteindegradation ist in viele zelluläre Prozesse wie die Regulation des Zell-Zyklus, DNA-Reperaturmechanismen, Transkription und Apoptose involviert (Lilienbaum, 2013). Dabei realisiert das UPS seine Funktion innerhalb der verschiedenen Prozesse durch den selektiven Abbau oder die Prozessierung bestimmter Proteine. Die Selektivität des Systems wird dabei durch die Markierung der Substrate sichergestellt. Nach einer Phosphorylierung der Ziel-Proteine werden diese ubiquitiniert und damit für den proteasomalen Abbau oder die Prozessierung gekennzeichnet. Ubiquitin ist ein globuläres, hoch konserviertes Protein, das in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiert wird. Es kann reversibel an Proteine binden und damit deren Eigenschaften und Lokalisation

verändern (Lilienbaum, 2013; Pickart und Eddins, 2004). Die Ubiquitinierung der Protein-Substrate erfolgt durch einen dreistufigen Prozess, bei dem Ubiquitin von verschiedenen Enzymen auf ein Substrat übertragen wird (siehe Abbildung 5A). In einem ersten Schritt wird Ubiquitin unter Energieverbrauch (ATP zu AMP+PPi) an das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 gekoppelt. Das aktivierte Ubiquitin wird im nächsten Schritt auf das Enzym E2 transferiert, welches eine Ubiquitin-konjugierende Funktion ausübt. Im finalen Schritt wird Ubiquitin auf das Substrat übertragen. Dieses ist an die Ubiquitin-Ligase E3 gebunden. Je nach Typ der E3-Ligase kann Ubiquitin entweder direkt von E2 auf das Substrat oder zunächst von E2 auf E3 und dann auf das Substrat übertragen werden. Weitere Ubiquitine werden nach und nach über die E3-Ligase an das Substrat gebunden, sodass eine Polyubiquitinierung des Substrats vorliegt (Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart und Eddins, 2004). Damit das markierte Substrat vom Proteasom erkannt werden kann, muss eine Kette von mindestens vier Ubiquitinresten vorliegen (Kravtsova-Ivantsiv und Ciechanover, 2012). Sobald das Proteasom das markierte Substrat identifiziert und gebunden hat, wird dieses entfaltet und degradiert (siehe Abbildung 5B).

Hierbei stellt das 26S Proteasom einen Multiproteinkomplex mit ATP-abhängiger Protease-Funktion dar, der sich in mehrere Subkomplexe unterteilen lässt. Neben der katalytischen 20S-Untereinheit sind zwei regulatorische 19S-Untereinheiten zu finden. Diese sitzen wie zwei Deckel auf beiden Enden der zylindrisch aufgebauten 20S-Untereinheit und bestehen aus 18 unterschiedlichen Proteinen, die für die Substratbindung (mittels Psmd4 oder Psmd2), Deubiquitinierung (mittels Psmd14) und Proteinentfaltung sowie die anschließende Degradation von essentieller Bedeutung sind (Elsasser et al., 2002; Gomez et al., 2011; Leggett et al., 2002; Liu und Jacobson, 2013; Verma et al., 2002; Yao und Cohen, 2002). Die tonnenförmige 20S-Untereinheit ist aus vier heptameren Ringen aufgebaut und beinhaltet im Inneren verschiedene katalytische Proteasen, die die Proteindegradation realisieren (Coux et al., 1996; Groll et al., 1997).

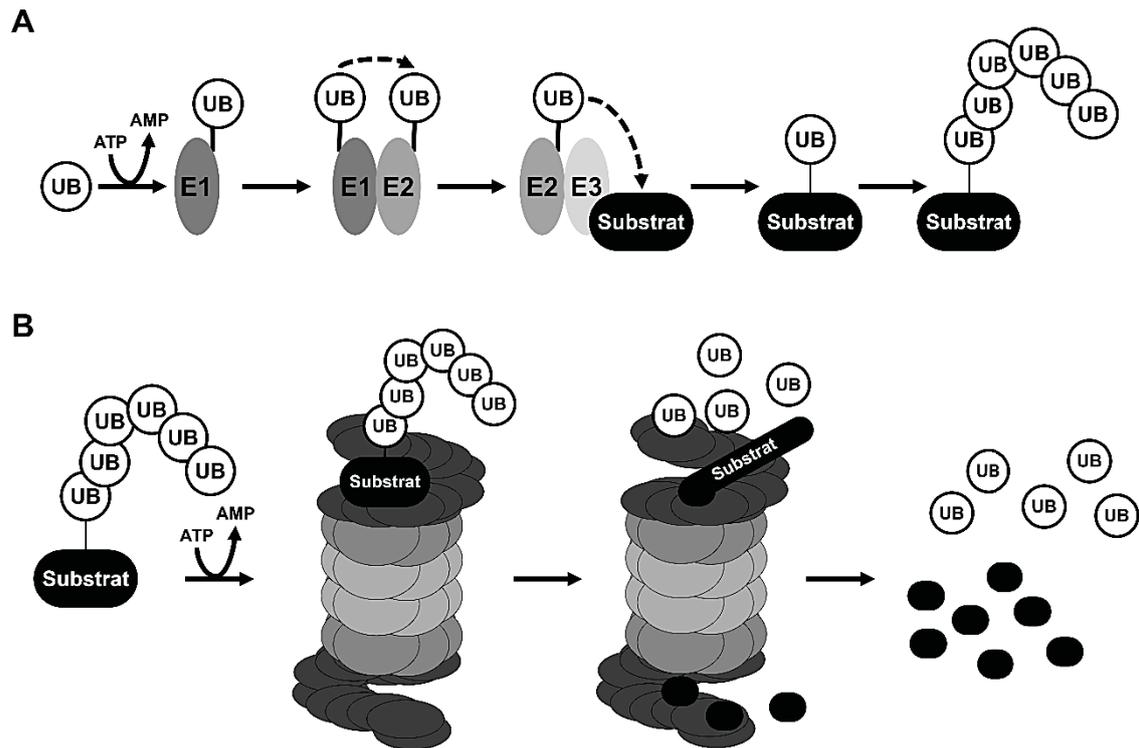


Abbildung 5: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

(A) In einem ersten Schritt wird das Substrat durch Polyubiquitinierung markiert. Hierzu wird Ubiquitin (UB) über eine dreistufige Enzym-Kaskade von E1 auf E2 und schließlich mit Hilfe von E3 auf das Substrat übertragen. (B) Das ubiquitinierte Substrat wird vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut. UB wird hierbei dekonjugiert und kann erneut zur Markierung von Substraten verwendet werden.

Die Lokalisation der Proteasomen umfasst sowohl das Zytosol als auch den Zellkern, die Zentrosomen und die ziliäre Basis (Brooks et al., 2000; Gerdes et al., 2007; Wigley et al., 1999). Auf diese Weise können Proteasomen ihre essentielle Funktion in der Proteindegradation oder Prozessierung und der damit zusammenhängenden Signalwegregulation gesamtzellulär ausüben. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die proteolytische Prozessierung der Gli-Proteine im Hh-Signalweg vom Proteasom realisiert wird (Schrader et al., 2011; Wang et al., 2000) (siehe 3.1.4). Zusätzlich ließ sich ein Zusammenhang zwischen proteasomaler Aktivität und ziliären Proteinen nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Basalkörper-Proteine Bbs4, Bbs7 und Ofd1 die gesamtzelluläre proteasomale Aktivität positiv regulieren (Gascue et al., 2012; Gerdes et al., 2007; Liu et al., 2014). Auch eine Auswirkung der proteasomalen Aktivität auf die Ziliogenese und den IFT wurde belegt (Guo et al., 2011; Kasahara et al., 2014; Zalli et al., 2012). Zudem

konnte gezeigt werden, dass das TZ-Protein Rpgrip1l die proteasomale Aktivität an der ziliären Basis reguliert (Gerhardt et al., 2015). Dies geschieht durch eine Interaktion der RID C2 von Rpgrip1l mit Psm2, einem Protein der 19S-Untereinheit des Proteasoms. Die Interaktion findet direkt an der ziliären Basis statt und daher wird nur das Proteasom, welches dort lokalisiert, von Rpgrip1l reguliert. Die gesamtzelluläre proteasomale Aktivität bleibt unverändert. Damit wird in dieser Studie nicht nur gezeigt, dass Rpgrip1l das Proteasom reguliert, sondern es wird ein Nachweis für ein unabhängig reguliertes Proteasom an der ziliären Basis erbracht. Zusätzlich zeigt die Studie, dass die Prozessierung der Gli3-Proteine während der Hh-Signalgebung von diesem ziliären Proteasom realisiert wird. Desweiteren werden in dieser Studie *in vitro* und *ex vivo* Behandlungen *Rpgrip1l*-negativer MEFs und Embryonen durchgeführt, bei denen die Reduktion der proteasomalen Aktivität mit Hilfe des Proteasom-Aktivators Sulforaphan (SFN) wiederhergestellt werden kann (Gerhardt et al., 2015).

3.4.2 Autophagie und Zilie

Autophagie ist ein zellulärer Degradationsprozess, mit dessen Hilfe langlebige Proteine, Zellorganellen und Proteinaggregate abgebaut werden können. Damit spielt Autophagie eine wichtige Rolle in der zellulären Dynamik. Fehlfunktionen der Autophagie können zu einem breiten Spektrum an Erkrankungen führen. So wird eine Autophagie-Dysfunktion mit Krankheiten wie Neurodegenerationen, Myopathie, Diabetes, Herz- und Lungenerkrankungen und Krebs in Verbindung gebracht (Wirawan et al., 2012). In Säugetieren gibt es drei verschiedene Formen der Autophagie: die Mikroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie („chaperone-mediated autophagy“, CMA) und die Makroautophagie. Bei allen drei Formen werden Substrate zu Lysosomen transportiert und mit deren Hilfe abgebaut (Yang und Klionsky, 2010). Allein durch die Art des Substrattransports lassen sich Mikroautophagie, CMA und Makroautophagie unterscheiden. Während sich die Mikroautophagie durch Invagination der lysosomalen Membran auszeichnet, durch die der Cargo in das Lysosom gelangt (Mijaljica et al., 2011), wird bei der CMA keine membranöse Struktur benötigt. Hier wird das Substrat

von Chaperonen identifiziert und direkt in das Lysosom transportiert (Massey et al., 2004). Die Makroautophagie zeichnet sich durch die Ausbildung des Autophagosoms aus. Dieses spezielle Organell entsteht durch die *de novo* Bildung einer Doppelmembran im Zytoplasma der Zelle, die als Isolationsmembran bezeichnet wird. Die Isolationsmembran wird verlängert und nimmt eine sichelförmige Struktur an. Sie wird nun als Phagophore bezeichnet (Abbildung 6). Hierbei ist teils noch nicht bekannt, auf welche Weise und woraus die Isolationsmembran und die Phagophore gebildet werden. Man weiß jedoch, dass Proteine wie Lc3, verschiedene Atgs, das Endoplasmatische Reticulum, der Golgi-Apparat und die Plasmamembran an der Ausbildung beteiligt sind und dass die Ausbildung der Membran von einem bestimmten Phosphatidylinositol 3-OH Kinasen (PI(3)K)-Komplex kontrolliert wird (Bansal et al., 2018; Galluzzi et al., 2017; Gómez-Sánchez et al., 2018; Hayashi-Nishino et al., 2009; Kang et al., 2011; Lilienbaum, 2013; Mizushima et al., 2011; Parzych und Klionsky, 2014; Puri et al., 2018; Ylä-Anttila et al., 2009). Nach der Formation der Phagophore wird die Membran verlängert und umschließt die Substrate, wobei dies unspezifisch oder spezifisch geschehen kann (Mijaljica et al., 2012). Während unspezifische Makroautophagie vor allem durch Nährstoffmangel und Energieverlust induziert wird, dient die spezifische Autophagie der kontinuierlichen Instandhaltung der Zelle (Chen und Klionsky, 2011; Isakson et al., 2013). Ein Mechanismus der spezifischen Substraterkennung durch Autophagie ist zum Beispiel die Markierung der Substrate mit Ubiquitin. Ubiquitin wiederum wird vom Adapterprotein p62 erkannt, welches an das Lc3 der Phagophorenmembran bindet (Bjørkøy et al., 2006; Johansen und Lamark, 2011; Øverbye et al., 2007; Vadlamudi et al., 1996). Sobald die Phagophore die Substrate vollständig umgeben hat, wird sie als Autophagosom bezeichnet (Abbildung 6). Das Autophagosom transportiert die Substrate zu einem Lysosom und die Vesikel fusionieren miteinander. Innerhalb des Autolysosoms werden die innere Membran und die Substrate durch das saure Milieu und die Hydrolasen des Lysosoms abgebaut (Yang und Klionsky, 2010) (Abbildung 6). Die Abbauprodukte werden mit Hilfe der lysosomalen Permeasen zurück in das Zytoplasma transportiert und können recycelt werden (Yorimitsu und Klionsky, 2005).

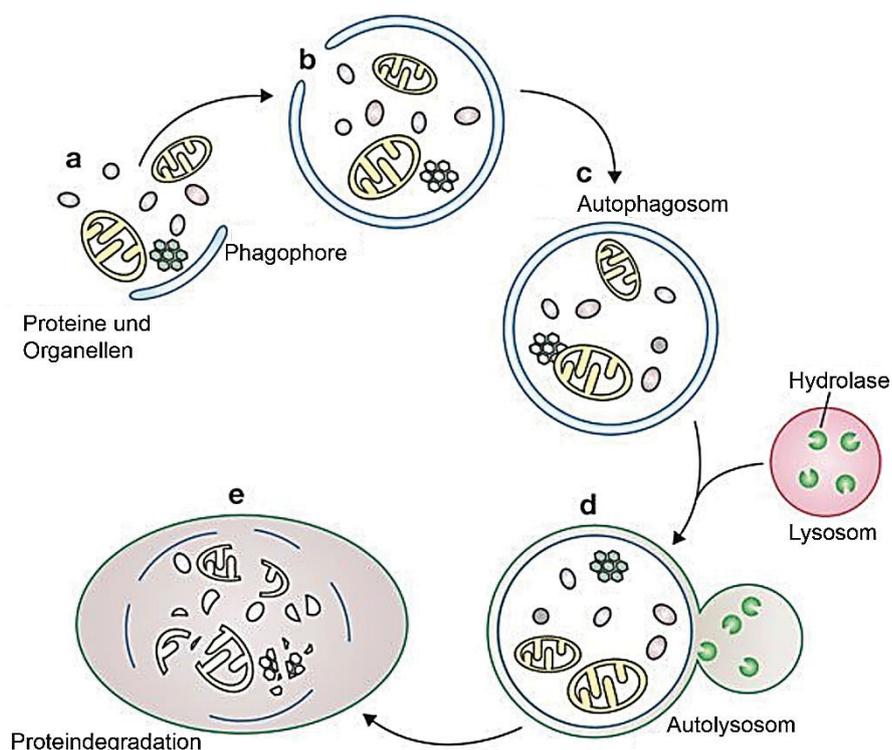


Abbildung 6: Proteindegradation via Makroautophagie

Die Initiation der Autophagie beginnt mit der Ausbildung einer Doppelmembran. Diese nimmt eine Sichel-Form an und wird als Phagophore bezeichnet (a). Die Phagophorenmembran wird verlängert und umschließt die Substrate (b). Die Substrate werden vom Autophagosom (c) zum Lysosom transportiert. Autophagosom und Lysosom verschmelzen zum Autolysosom (d) und die innere Membran des Autophagosoms sowie die Substrate werden von den Hydrolasen des Lysosoms abgebaut (e). Modifiziert nach Xie und Klionsky (Xie und Klionsky, 2007).

Makroautophagie bedarf einer strikten Kontrolle, die zum Teil über den mTorc1 (mechanistic target of rapamycin complex 1)-Signalweg realisiert wird. Dieser hoch konservierte Signalweg ist neben der Autophagieregulation für die Proteinsynthese zuständig. Hierbei reguliert er die beiden Prozesse in entgegengesetzte Richtung. Ist der mTorc1-Signalweg ausgeschaltet, findet weniger Proteinsynthese und mehr Autophagie statt. Liegt mTorc1 aktiviert vor, wird die Proteinsynthese gesteigert und die Autophagie durch Inhibition der Bildung von Autophagosomen reduziert. mTorc1 ist somit ein negativer Regulator der Autophagie (Jung et al., 2010; Kim et al., 2011; Martina et al., 2012; Rocznik-Ferguson et al., 2012; Saxton und Sabatini, 2017; Settembre et al., 2012). Aktiviert wird der mTorc1-Signalweg durch die Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase mTor an Ser2448. Diese Phosphorylierung kann zum Beispiel durch Akt erfolgen (Navé et al., 1999). Neben einer negativen Regulation durch mTorc1 wird Autophagie von weiteren Signalwegen beeinflusst. So konnte gezeigt werden,

dass sich der Zilien-assoziierte Hh-Signalweg (siehe 3.1.4) positiv auf Autophagie auswirkt und Bestandteile der Autophagosomen an ziliären Strukturen wie dem Axonem oder dem Basalkörper lokalisieren (Pampliega et al., 2013). Umgekehrt hat Autophagie auch einen Einfluss auf die Ziliogenese und ziliäre Proteine wie Ofd1 (Tang et al., 2013).

Generell stellt die Makroautophagie die am besten charakterisierte Form der Autophagie dar und gilt als deren Hauptmechanismus (Yorimitsu und Klionsky, 2005). Aus diesem Grund wird der Oberbegriff Autophagie häufig als Synonym für Makroautophagie verwendet (Lilienbaum, 2013). Da in der vorliegenden Arbeit und den dazugehörigen Publikationen ausschließlich die Makroautophagie thematisiert wird und somit keine Unterscheidung der einzelnen Formen notwendig ist, wird die Makroautophagie im Folgenden durch den Begriff Autophagie beschrieben.

4 Zielsetzung

Ziliopathien sind genetisch bedingte Erkrankungen, die auf die Dysfunktion von Zilien zurückzuführen sind. Da Zilien auf nahezu jeder Zelle eines Wirbeltiers zu finden sind und in der Entwicklung vieler Organe eine essentielle Funktion ausüben, zeigen Ziliopathiepatienten ein breites Spektrum an Symptomen. Viele Ziliopathien sind als lebensbedrohlich einzustufen und Patienten erreichen das Erwachsenenalter häufig nicht. Ein Gen, dessen Mutationen zur Ausbildung verschiedener und besonders schwerwiegender Ziliopathien führt, ist *RPGRIP1L*. Dabei sind die Mechanismen, die zur Ausbildung einer Ziliopathie führen, noch relativ unbekannt und eine kurative Therapie ist nicht verfügbar.

Das Ziel meiner Arbeiten ist es, die verschiedenen Funktionen von Rpgrip1l an der Zilie aufzudecken und damit die Mechanismen zu entschlüsseln, die der Ausbildung einer Ziliopathie, die auf einer *RPGRIP1L*-Mutation beruht, zu Grunde liegen. Auf Basis dieser Erkenntnisse könnten anschließend Therapieansätze für Ziliopathiepatienten entwickelt werden.

5 Originalarbeiten

5.1 Regulation des Hedgehog-Signalwegs durch das ziliäre

Proteasom

5.1.1 Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils

In diesem Übersichtsartikel wird detailliert die Verbindung zwischen dem ziliären Proteasom und der Hedgehog (Hh)-Signalgebung beschrieben. Der Hh-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der embryonalen Entwicklung und Störungen des Signalweges resultieren in schwerwiegenden Erkrankungen (Mullor et al., 2002) (siehe 3.1.4). Daher ist es von besonderer Relevanz die genaue Funktionsweise des Hh-Signalweges zu studieren. Es wurde bereits gezeigt, dass der Signalweg durch Zilien vermittelt wird. Jedoch ist die Frage, wie Zilien den Hh-Signalweg vermitteln, bis heute nur teilweise geklärt. 2015 konnte gezeigt werden, dass ein Zilien-assoziiertes Proteasom existiert, welches unabhängig von anderen Proteasomen in der Zelle reguliert wird (Gerhardt et al., 2015) (siehe 3.4.1). In diesem Übersichtsartikel wird erläutert, dass dieses ziliäre Proteasom entscheidend an der Hh-Signalvermittlung beteiligt ist und in Zukunft als Zugangspunkt für Therapien von Hh-assoziierten Krankheiten verwendet werden könnte.

Ich war für Teile der Literaturrecherche dieses Artikels verantwortlich und habe alle Abbildungen gestaltet. Zusätzlich habe ich beim Verfassen des Artikels assistiert.

Eigenanteil in Prozent: 30%

5.1.2 Publikation (Gerhardt et al., 2016b)

Das Manuskript "Control of Hedgehog signalling by the cilia-regulated proteasome." ist im Folgenden angehängt (S. 34-49). Hierbei ist zu beachten, dass in der veröffentlichten Version dieser Dissertation die Originalpublikation aus urheberrechtlichen Gründen nicht beigefügt ist.

Name des Journals: *Journal of Developmental Biology*

Art des Artikels: Übersichtsartikel

Gerhardt, C., **Wiegering, A.**, Leu, T. and Rütger, U. (2016). Control of Hedgehog signalling by the cilia-regulated proteasome. *J. Dev. Biol.* 4, 27.

Doi: 10.3390/jdb4030027

5.2 Die Rolle des Hedgehog-Signalwegs in der Ausbildung des ventrikulären Septums

5.2.1 Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils

Dieser Übersichtsartikel thematisiert den Zusammenhang zwischen der Hedgehog (Hh)-Signalgebung und der Entstehung ventrikulärer Septendefekte (VSDs). Das ventrikuläre Septum (VS) ist Bestandteil des Herzens und trennt den linken und rechten Ventrikel voneinander. Defekte in der Ausbildung des VS führen zu einer Vermischung von Sauerstoffreichem mit Sauerstoff-armem Blut und begünstigen die Entstehung von kardialen Lungenödemen und einer Hypertrophie des linken Ventrikels (Brickner et al., 2000; Ferreira et al., 2009; Selicorni et al., 2009). VSDs gehören zu den am häufigsten auftretenden kongenitalen Herzerkrankungen und können gegenwärtig nur mittels eines operativen Eingriffs behandelt werden (Hoffman und Kaplan, 2002). Interessanterweise ist ein VSD auch ein häufig auftretendes Symptom bei verschiedenen Ziliopathien (Gerhardt et al., 2013; Koefoed et al., 2014) (siehe 3.2). Um einen operativen Eingriff zu umgehen und eine medikamentöse Therapie für VSDs anwenden zu können, wird nach den Ursachen der VSD-Entstehung gesucht. Hierbei konnten einige Studien zeigen, dass unter anderem der Hh-Signalweg eine Rolle bei der Ausbildung des VS spielt. Da dieser Signalweg durch Zilien vermittelt wird (siehe 3.1.4), wird deutlich, wieso VSDs als Symptom vieler Ziliopathien auftreten können. In diesem Artikel wird eine Zusammenfassung über die Verbindung von Hh-Signalweg und ventrikulärer Septenentwicklung gegeben, sowie mögliche medikamentöse Behandlungsstrategien für VSDs diskutiert. So wird die Frage aufgeworfen, ob eine Hh-gerichtete Behandlung während der Schwangerschaft die Entwicklung von VSDs beeinflussen kann.

Ich war für Teile der Literaturrecherche dieses Artikels verantwortlich und habe alle Abbildungen gestaltet. Zusätzlich habe ich beim Verfassen des Artikels assistiert.

Eigenanteil in Prozent: 40%

5.2.2 Publikation (Wiegering et al., 2017)

Das Manuskript “The role of Hedgehog signalling in the formation of the ventricular septum.” ist im Folgenden angehängt (S. 52-65). Hierbei ist zu beachten, dass in der veröffentlichten Version dieser Dissertation die Originalpublikation aus urheberrechtlichen Gründen nicht beigefügt ist.

Name des Journals: *Journal of Developmental Biology*

Art des Artikels: Übersichtsartikel

Wiegering, A., Rüther, U. and Gerhardt, C. (2017). The role of Hedgehog signalling in the formation of the ventricular septum. *J. Dev. Biol.* 5, 17.

Doi: 10.3390/jdb5040017

5.3 Das ziliäre Protein Rpgrip1l steuert Autophagie unabhängig von seiner Proteasom-regulierenden Funktion an der ziliären Basis in embryonalen Maus-Fibroblasten

5.3.1 Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils

Autophagie ist neben dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) einer der wichtigsten Protein-Degradationsprozesse in Zellen (siehe 3.4). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Autophagie mit primären Zilien assoziiert ist und eine Verbindung zum Hedgehog (Hh)-Signalweg besteht (Pampliega et al., 2013; Tang et al., 2013) (siehe 3.4.2). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass mTorc1 Autophagie negativ beeinflusst (Jung et al., 2010). Nachdem in früheren Studien eine Verbindung von Rpgrip1l zum Proteasom nachgewiesen werden konnte, bei der Rpgrip1l die proteasomale Aktivität positiv beeinflusst (Gerhardt et al., 2015) (siehe 3.4.1), wird in dieser Arbeit die Aktivität der Autophagie unter *Rpgrip1l*-Defizienz analysiert. Beide Protein-Degradationssysteme sind von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase eines Organismus und daher verfügen Zellen über einen Sicherheitsmechanismus, bei dem die zwei Degradations-Systeme entgegengesetzt gesteuert werden. Ist eines der Systeme herunterreguliert, wird das andere hochreguliert (Levine und Kroemer, 2008; Lilienbaum, 2013). Im Fall eines *Rpgrip1l*-Verlusts werden jedoch beide Systeme unabhängig voneinander herunter reguliert. So liegt in *Rpgrip1l*-negativen embryonalen Maus-Fibroblasten (MEFs) neben einer verminderten proteasomalen Aktivität auch eine verringerte Autophagie vor. Realisiert wird die Regulation der Autophagie über eine Signalkaskade, bei der Rpgrip1l die mTorc1-Aktivität mittels Akt inhibiert. Bei einem Verlust von Rpgrip1l liegt eine erhöhte Menge an phosphoryliertem und somit aktiviertem Akt in den Zilien von MEFs vor. Phosphoryliertes Akt wiederum phosphoryliert und aktiviert mTor an der ziliären Basis, was wiederum zu einer reduzierten Autophagie führt. Durch Behandlung der *Rpgrip1l*-negativen MEFs mit dem mTor-Inhibitor Rapamycin konnte die autophagische Aktivität wiederhergestellt werden und die Zilienlänge in den *Rpgrip1l*-negativen MEFs gerettet werden. Die proteasomale Aktivität hingegen wurde durch diese Behandlung nicht beeinflusst.

Für diesen Artikel habe ich Immunfluoreszenzanalysen, Quantifizierungen, statistische Analysen sowie Arbeiten in der Zellkultur durchgeführt. Zusätzlich habe ich bei der Konzeption einiger Teilversuche, dem Verfassen des Artikels und der Aufbereitung der Abbildungen assistiert.

Eigenanteil in Prozent: 30%

5.3.2 Publikation (Struchtrup et al., 2018)

Das Manuskript "The ciliary protein RPGRIP1L governs autophagy independently of its proteasome-regulating function at the ciliary base in mouse embryonic fibroblasts" ist im Folgenden angehängt (S. 69-85). Hierbei ist zu beachten, dass in der veröffentlichten Version dieser Dissertation die Originalpublikation aus urheberrechtlichen Gründen nicht beigefügt ist.

Name des Journals: *Autophagy*

Art des Artikels: Forschungsartikel

Impact Factor 2017 (Journal Homepage): 11.1

Referenz:

Struchtrup, A., **Wiegering, A.**, Stork, B., Rütter, U. and Gerhardt, C. (2018). The ciliary protein RPGRIP1L governs autophagy independently of its proteasome-regulating function at the ciliary base in mouse embryonic fibroblasts. *Autophagy* 14, 567-583.

Doi: 10.1080/15548627.2018.1429874

5.4 Zelltyp-spezifische Regulation der Transitionszonen-Assemblierung in Wirbeltieren

5.4.1 Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils

Die Transitionszone (TZ) erfüllt eine Torwächterfunktion innerhalb der Zilie und ist somit von entscheidender Bedeutung für ihren Aufbau und ihre Funktion (Benzing und Schermer, 2011; Betleja und Cole, 2010; Chih et al., 2011; Craige et al., 2010; Czarnecki und Shah, 2012; Deane et al., 2001; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Omran, 2010; Reiter et al., 2012; Williams et al., 2011) (siehe 3.1.2). Störungen innerhalb der TZ, die zum Beispiel vorliegen, wenn Gene mutiert sind, die für TZ-Proteine kodieren, führen oft zu schwerwiegenden Erkrankungen (Czarnecki und Shah, 2012; Hildebrandt et al., 2011). Aus diesem Grund ist es von enormer Bedeutung die Assemblierung der TZ zu verstehen. Grundlegende Erkenntnisse über den Aufbau und die Struktur der TZ wurden aus Studien in *C. elegans* gewonnen, auf deren Grundlage Rpgrip1I an die Spitze der TZ-Assemblierungshierarchie gesetzt wurde. So wird Rpgrip1I hier benötigt um die Mitglieder aller TZ-Module zu akkumulieren (Li et al., 2016; Sang et al., 2011; Williams et al., 2011) (siehe 3.1.3). Um aber die Funktion von Rpgrip1I in der TZ-Assemblierung von Vertebraten zu verstehen, wurden in der vorliegenden Studie murine und humane Zellen sowie murines Gewebe untersucht. Es wurden Komponenten der verschiedenen Module analysiert und hierbei zeigt sich, dass ein deutlicher Unterschied in der TZ-Assemblierung von Invertebraten und Vertebraten besteht. So steht Rpgrip1I in Vertebraten nur Zelltyp-spezifisch bedingt an der Spitze der TZ-Assemblierungshierarchie. In einigen Zelltypen ist Rpgrip1I allein in der Lage alle TZ-Module zu organisieren, was der Situation in *C. elegans* entspricht. In anderen Zelltypen hingegen werden nicht alle Module allein von Rpgrip1I beeinflusst. Hier wird die Assemblierung der TZ-Proteine durch das Zusammenspiel von Rpgrip1I und Rpgrip1 reguliert. Rpgrip1 ist durch eine Genom-Duplikation entstanden und ist in Invertebraten nicht vorhanden. Somit scheint die TZ-Assemblierungshierarchie in Vertebraten komplexer zu sein als in Invertebraten.

Für diesen Artikel habe ich Immunfluoreszenzanalysen und zugehörige Quantifizierungen, statistische Analysen, histologische Analysen und zugehörige Quantifizierungen, transmissionselektronenmikroskopische Studien (TEM) sowie Arbeiten in der Zellkultur durchgeführt. Ich habe 90% der Abbildungen angefertigt. Zusätzlich habe ich bei der Konzeption einiger Teilversuche und dem Verfassen des Artikels mitgewirkt.

Angabe der Eigenanteile der jeweiligen Autoren (entnommen aus der Publikation):

CG conceived the study and designed experiments. AW, LK, SK, JML and TL performed immunofluorescence studies with subsequent intensity quantifications, cilia length measurements and statistics. AW performed all histological studies (with assistance from SK and TL). AW measured defect frequencies. AW performed the transmission electron microscopic studies. RD, LK and SD inactivated several genes in different cells via the CRISPR/Cas9 system. ASp, SK and CG performed the Western blot investigations. RD performed phylogenetic and evolutionary studies. TZ and CG performed fluorescence intensity quantifications of 3D reconstructed images obtained by using 3D-SIM. ASt performed the qRT-PCR analysis. FL, CV and SS-M generated *Nphp4*^{-/-} MEFs. FL and SS provided *Nphp4*^{-/-} mouse embryos. AW and RD prepared figures. CG wrote the manuscript with assistance from AW and UR. All authors approved the manuscript. UR obtained funding for the study.

Eigenanteil in Prozent: 50%

5.4.2 Publikation (Wiegering et al., 2018a)

Das Manuskript "Cell type-specific regulation of ciliary transition zone assembly in vertebrates" ist im Folgenden angehängt (S. 89-112). Hierbei ist zu beachten, dass in der veröffentlichten Version dieser Dissertation die Originalpublikation aus urheberrechtlichen Gründen nicht beigefügt ist.

Name des Journals: *The EMBO Journal*

Art des Artikels: Forschungsartikel

Impact Factor 2017 (Journal Homepage): 10.6

Referenz:

Wiegering A., Dildrop R., Kalfhues L., Spsychala A., Kuschel S., Lier J.M., Zobel T., Dahmen S., Leu T., Struchtrup A., Legendre F., Vesque C., Schneider-Maunoury S., Saunier S., Rütter U., Gerhardt C. (2018). Cell type-specific regulation of ciliary transition zone assembly in vertebrates. *EMBO J.* 37, pii: e97791.

Doi 10.15252/emj.201797791

5.5 Die Funktion des ziliären Proteins Rpgrip1l in der Entwicklung und Krankheitsausbildung

5.5.1 Zusammenfassung und Bewertung des Eigenanteils

In dieser Arbeit wird eine Zusammenfassung über alle bis dato gewonnenen Erkenntnisse der Funktionen von Rpgrip1l gegeben. Die Rolle von Rpgrip1l bei der Ausbildung verschiedener Ziliopathien (siehe 3.2) wird darin ebenso diskutiert wie die Funktionen von Rpgrip1l in der TZ-Assemblierung (siehe 3.3 und 5.4) und den Protein-Degradationsprozessen (siehe 3.4.1 und 5.3). Zusätzlich werden mögliche Funktionen von Rpgrip1l bei der Entstehung von Tumoren, der Zell-Zyklus-Regulation durch das Aktin-Zytoskelett und der Entwicklung von Fettleibigkeit erörtert. Auch potentielle Schnittstellen der einzelnen Funktionen von Rpgrip1l werden in dem vorliegenden Übersichtsartikel diskutiert. So könnte zum Beispiel die TZ-Assemblierung durch Protein-Degradation vermittelt werden. Außerdem wird verdeutlicht, dass eine medikamentöse Beeinflussung der Protein-Degradationsprozesse über SFN oder Rapamycin eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit von Ziliopathien darstellt.

Ich war für Teile der Literaturrecherche dieses Artikels verantwortlich und habe alle Abbildungen gestaltet. Zusätzlich habe ich beim Verfassen des Artikels mitgewirkt.

Eigenanteil in Prozent: 40%

5.5.2 Publikation (Wiegering et al., 2018b)

Das Manuskript "The ciliary protein Rpgrip1l in development and disease" ist im Folgenden angehängt (S. 115-123). Hierbei ist zu beachten, dass in der veröffentlichten Version dieser Dissertation die Originalpublikation aus urheberrechtlichen Gründen nicht beigefügt ist.

Name des Journals: *Developmental Biology*

Art des Artikels: Übersichtsartikel

Impact Factor 2017 (Journal Homepage): 3.262

Referenz:

Wiegering A., Rütter U., Gerhardt C. (2018). The ciliary protein Rpgrip1l in development and disease. *Dev Biol.* [Epub ahead of print]

Doi: 10.1016/j.ydbio.2018.07.024

6 Diskussion

6.1 Die essentielle Bedeutung der Zilie und des TZ-Proteins

Rpgrip1l in der Entwicklung und Homöostase von Wirbeltieren

Mehr und mehr menschliche Erkrankungen lassen sich auf eine Störung der Zilienfunktion zurückführen. So werden zum Beispiel bei bestimmten Tumorerkrankungen und Formen der Schizophrenie Ziliendefekte als Ursache vermutet (Castresana, 2015; Marley und von Zastrow, 2012; Muñoz-Estrada et al., 2018; Reiter und Leroux, 2017). Eine ziliäre Dysfunktion wird hierbei besonders oft durch Mutationen verschiedener Gene hervorgerufen, die für Proteine kodieren, die in der TZ lokalisieren (Czarnecki und Shah, 2012). Die molekularen Mechanismen, in die diese TZ-Proteine involviert sind und die bei einer Störung zur Ausbildung einer Ziliopathie führen, sind bis heute nur ansatzweise beschrieben. In diesem Zusammenhang können auch die Interaktionen der einzelnen TZ-Proteine untereinander sowie die Interaktion von TZ-Proteinen mit Basalkörper-Proteinen, Membranassoziierten-Proteinen, Proteinen des IFTs oder extraziliären Proteinen nur zum Teil nachvollzogen werden (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Goetz et al., 2017; Gonçalves und Pelletier, 2017; Huang et al., 2011; Lambacher et al., 2016; Li et al., 2016; Sang et al., 2011; Schouteden et al., 2015; Williams et al., 2011). Um Behandlungsstrategien für Ziliopathiepatienten zu entwickeln, liegt der Fokus der Zilienforschung daher auf der Entschlüsselung ebendieser Mechanismen und Interaktionen. Ein Gen, welches für ein TZ-Protein kodiert und für die biomedizinische Forschung von besonderem Interesse ist, stellt *Rpgrip1l* dar. Dieses Gen wurde erstmals 2002 als eines von sechs deletierten Genen der *Ft*-Mausmutante beschrieben (Peters et al., 2002). Homozygot mutante *Rpgrip1l*-Mausembryonen weisen Entwicklungsdefekte in nahezu jedem Organ auf und sind embryonal letal (siehe 3.3). Die Defekte entsprechen hierbei den Symptomen einer Ziliopathie, sodass vermutet wurde, dass in den *Rpgrip1l*-negativen Tieren ein Ziliendefekt vorliegt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass *Rpgrip1l* an der Zilie lokalisiert (Vierkotten et al., 2007) und zudem menschliche Ziliopathien auf Mutationen von *RPGRIP1L* beruhen können. So weisen Patienten mit einer *RPGRIP1L*-Mutation

schwerwiegende Ziliopathien wie das JBTS und MKS auf (Arts et al., 2007; Delous et al., 2007) (siehe 3.3). Demnach ist *Rpgrip11* von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase von Wirbeltieren. In wirbellosen Organismen hingegen scheint *Rpgrip11* eine weit weniger essentielle Funktion auszuüben. Generell sind Zilien für die Entwicklung und Homöostase der Invertebraten von geringerem Interesse, da hier nur wenige Zelltypen überhaupt Zilien ausbilden und die Entwicklung auch bei einem Ziliendefekt weitestgehend normal verläuft (Basto et al., 2006; Inglis et al., 2007; Pratt et al., 2016). So führen Ziliendefekte in *C. elegans* lediglich zu einer leicht veränderten Lebensdauer und Körperlänge (Apfeld und Kenyon, 1999; Bae und Barr, 2008). Trotz dieser klaren Diskrepanz zwischen Invertebraten und Vertebraten, konnten erste Aussagen über die Funktion von *Rpgrip11* mit Hilfe von Analysen in *C. elegans* getroffen werden.

6.2 Die Funktion von *Rpgrip11* in der Zelltyp-spezifischen

TZ-Assemblierung von Wirbeltieren

Die ziliäre TZ ist von enormer Bedeutung für die Funktion und den Aufbau der Zilie und kontrolliert den ziliären Import und Export von Proteinen (Benzing und Schermer, 2011; Betleja und Cole, 2010; Chih et al., 2011; Craige et al., 2010; Czarnecki und Shah, 2012; Deane et al., 2001; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Omran, 2010; Reiter et al., 2012; Williams et al., 2011). Sie übernimmt die Funktion eines Torwächters und ist dabei aus verschiedenen Proteinen aufgebaut. Die TZ-Proteine konnten mit Hilfe von Interaktionsstudien in *C. elegans* in vier verschiedene Module eingeteilt werden. Neben dem Mks/B9-Modul lassen sich TZ-Proteine dem Nphp1-4-8-Modul, dem Nphp5-6-Modul und dem Invs-Kompartiment zuordnen (Sang et al., 2011) (siehe 3.1.3). Hierbei können das Nphp1-4-8-Modul, das Nphp5-6-Modul und das Invs-Kompartiment unter dem Oberbegriff Nphp-Module zusammengefasst werden. Die Interaktion der verschiedenen Modulkomponenten untereinander und die Interaktion der verschiedenen Module miteinander spielt eine wichtige Rolle für den Aufbau der TZ und deren Funktion als ziliärer Torwächter (Chih et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2011). An der Spitze

der TZ-Assemblierungshierarchie in *C. elegans* steht Rpgrip1l, eine Komponente des Nphp1-4-8-Moduls. Sowohl die Komponenten des Mks/B9-Moduls, als auch die Komponenten der Nphp-Module sind in ihrer TZ-Akkumulation und damit auch ihrer Funktion von Rpgrip1l abhängig (Jensen et al., 2015; Williams et al., 2011). Neben Rpgrip1l stellt auch Cep290 eine wichtige Komponente in der TZ-Assemblierungshierarchie von *C. elegans* dar. So reguliert Rpgrip1l mit Hilfe von Cep290 die Komponenten des Mks/B9-Moduls, indem Cep290 für die Akkumulation dieser Komponenten verantwortlich ist (Li et al., 2016; Schouteden et al., 2015) (siehe 3.1.3).

Im Anschluss an die ersten Analysen der TZ-Assemblierung in *C. elegans* wurde versucht, die gewonnenen Erkenntnisse auf Wirbeltiere zu übertragen. Hierbei konnten übereinstimmende Ergebnisse zwischen *C. elegans* und *Mus musculus* sowie humanen Geweben gezeigt werden. So ist die Lokalisation von Tmem237, einer Komponente des Mks/B9-Moduls, in spezifischen Sammelrohrzellen der Mausniere von Rpgrip1l abhängig (Huang et al., 2011). Desweiteren weisen humane Fibroblasten von JBTS-Patienten mit *RPGRIP1L*-Mutation eine Reduktion der ziliären Menge von Nphp1 und Tctn2 auf. Damit beeinflusst Rpgrip1l hier sowohl das Nphp-Modul als auch das Mks/B9-Modul, zu dem Tctn2 zählt (Shi et al., 2017). Übereinstimmend damit konnten unsere Analysen zeigen, dass die Lokalisation der Nphp-Modulkomponenten Nphp1, Nphp4, Invs und Cep290 und der Komponenten Mks1, Tmem67, Tctn1, Tctn2 und Tctn3 des Mks/B9-Moduls in embryonalen Gliedmaßen von Rpgrip1l abhängt (Wiegering et al., 2018a). Neben embryonalen Gliedmaßen wurden auch MEFs und embryonale Nieren *Rpgrip1l*-negativer Mausembryonen untersucht. Hierbei zeigt sich sowohl in den MEFs als auch den mesenchymalen intertubulären und interductalen Zellen der embryonalen Niere ein abweichender Mechanismus der TZ-Assemblierung. In beiden Zelltypen sind zwar die Mengen aller analysierten Nphp-Modulmitglieder (Nphp1, Nphp4, Invs und Cep290) von Rpgrip1l abhängig, jedoch akkumulieren die Komponenten des Mks/B9-Moduls (Mks1, Tmem67 und Tctn1-3) unabhängig von Rpgrip1l in der ziliären TZ (Wiegering et al., 2018a). Zusätzlich kann in diesen Zelltypen beobachtet werden, dass unter *Rpgrip1l*-Defizienz eine erhöhte Menge des wirbeltierspezifischen Rpgrip1l-Homologs Rpgrip1 am

Basalkörper der Zilie vorliegt. In den Gliedmaßen ist die Menge an Rpgrip1 unter *Rpgrip1l*-Defizienz hingegen unverändert. Auf dieser Grundlage stellt sich die Frage, ob mit Hilfe der erhöhten Menge an Rpgrip1 ein Verlust von Rpgrip1l kompensiert wird. Um diese Fragestellung zu erörtern, wurden kombinierte *Rpgrip1*; *Rpgrip1l*-Mausmutanten erzeugt. Die *Rpgrip1^{nmf247}*-Mutation entspricht dabei einer Nullmutation und homozygot mutante *Rpgrip1^{nmf247}*-Mäuse erblinden im Alter von 4 Wochen (P28) aufgrund einer Degeneration der Photorezeptoren (Won et al., 2009). Im Menschen führen *RPGRIP1*-Mutationen zu Augenerkrankungen wie LCA, Retinis Pigmentosa (RP), Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CRD) und erblichen Netzhauterkrankungen (IRD) (Booij et al., 2005; Dryja et al., 2001; Gerber et al., 2001; Hameed et al., 2003; Tiwari et al., 2016) (zusammengefasst in Wiegering et al., 2018b). Die Analyse der einzelnen TZ-Proteine (Nphp1, Nphp4, Invs, Cep290, Mks1, Tmem67, Tctn1-3) in den kombinierten *Rpgrip1^{nmf247/nmf247}*; *Rpgrip1l^{-/-}*-MEFs zeigt eine Reduktion aller TZ-Modulmitglieder. Neben den Nphp-Modulkomponenten, die bereits in den Einzelmutanten (*Rpgrip1^{nmf247/nmf247}* und *Rpgrip1l^{-/-}*) reduziert vorliegen, sind nun auch die Mitglieder des Mks/B9-Moduls, welche in den Einzelmutanten (*Rpgrip1^{nmf247/nmf247}* und *Rpgrip1l^{-/-}*) nicht beeinträchtigt sind, in ihrer Menge drastisch reduziert. Hierdurch wird deutlich, dass Rpgrip1 und Rpgrip1l die TZ-Assemblierung in Vertebraten synergistisch regulieren. Zusätzlich zeigen diese Untersuchungen eine Zelltyp-spezifische Regulation der TZ-Assemblierung in Vertebraten, da in den embryonalen Gliedmaßen die Regulation aller TZ-Module von Rpgrip1l allein abhängig ist und eine synergistische Regulation hier nicht festgestellt werden kann. Das Zelltyp-spezifische Zusammenwirken von Rpgrip1l und Rpgrip1 könnte hierbei eine Art Sicherheitsmechanismus darstellen, durch den die Organentwicklung vor möglichen Defekten durch einzelne Mutationen geschützt wird. Falls Rpgrip1l geschädigt vorliegt, kann Rpgrip1 dessen Funktion teilweise übernehmen. Die Bedeutung dieses Sicherheitsmechanismus lässt sich durch morphologische Analysen der verschiedenen Mutanten veranschaulichen. So weisen *Rpgrip1^{nmf247/nmf247}*; *Rpgrip1l^{-/-}*-Embryonen im Vergleich zu *Rpgrip1l^{-/-}*-Embryonen eine erhöhte Defektfrequenz auf. Zum Beispiel zeigen 80% der homozygot mutanten *Rpgrip1l^{-/-}*-Embryonen an E18.5 Augendefekte, wohingegen die Frequenz in kombinierten

Rpgrip1^{nmf247/nmf247}; *Rpgrip1^{-/-}*-Embryonen auf 100% ansteigt. Auch die Frequenz der VSDs steigt von circa 30% auf mehr als 80% an. Noch deutlicher wird der synergistische Effekt von *Rpgrip1l* und *Rpgrip1* jedoch, wenn man die Zystenbildung in den Nieren verschiedener Embryonen betrachtet. *Rpgrip1^{-/-}*-Embryonen zeigen an E18.5 Zysten in der Niere, wohingegen heterozygot mutante *Rpgrip1l*-Embryonen keinerlei Nierendefekte aufweisen. Auch die Nieren der *Rpgrip1^{nmf247/nmf247}*-Embryonen sind phänotypisch unauffällig. Eine Kombination aus heterozygoter *Rpgrip1l*-Mutation und homozygoter *Rpgrip1*-Mutation hingegen führt zur Ausbildung von Nieren-Zysten (Wiegering et al., 2018a). Zusätzlich zu den Daten, die in embryonalen Mäusen erhoben wurden, konnte ein Nachweis für die synergistische Funktion von *Rpgrip1l* und *Rpgrip1* in der TZ-Assemblierung von humanen Zellen erbracht werden. So kann für humane embryonale Nierenzellen (HEK293) gezeigt werden, dass die Akkumulation von *Tctn2* als Komponente des Mks/B9-Moduls von der Zusammenarbeit von *Rpgrip1l* und *Rpgrip1* abhängt (Wiegering et al., 2018a). Somit scheint sich das TZ-Assemblierungs-Modell von Maus auf Mensch übertragen zu lassen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die TZ-Assemblierung in Vertebraten Zelltyp-spezifisch reguliert wird und dabei eine synergistische Funktion von *Rpgrip1l* und *Rpgrip1* vorliegt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die TZ-Assemblierung in Wirbeltieren auf komplexeren Mechanismen beruht als die TZ-Assemblierung in wirbellosen Tieren. In Invertebraten steht *Rpgrip1l* allein an der Spitze der TZ-Assemblierungs-Hierarchie und es lässt sich keine Zelltyp-Spezifität nachweisen. In neusten Studien wird allerdings vermutet, dass auch in Invertebraten eine differentielle Regulation der Zentrosom- und TZ-Proteine vorliegen könnte (Jana et al., 2018).

Generell kann die Zelltyp-spezifische Regulation der TZ-Assemblierung in Vertebraten eine Erklärungsmöglichkeit für die Organ-spezifische Ausbildung von Ziliopathie-Defekten darstellen. Ob das Modell der TZ-Assemblierung in Vertebraten hierbei vollständig von der Maus auf humanes Gewebe übertragbar ist, muss durch zukünftige Analysen in größerem Umfang untersucht werden. Zusätzlich müssen Untersuchungen weiterer Gewebetypen durchgeführt werden, um ein vollständiges Bild der Zelltyp-spezifischen TZ-Assemblierung

liefern zu können. Für die Diagnostik von Ziliopathien und die Suche nach kurativen Therapien stellen unsere Analysen bereits jetzt wichtige Grundlagen dar, auf deren Basis die Ursachen der Ziliopathieausbildung besser charakterisiert werden können. So ist es zum Beispiel denkbar, dass spezifische, eigentlich harmlose Mutationen von Genen, die für ziliäre Proteine kodieren, in ungünstigen Kombinationen zur Ausbildung einer Ziliopathie führen können. Demnach wären einige Gen-Polymorphismen oder Mutationen als Risikofaktoren für die Ausbildung einer Ziliopathie anzusehen. Um diese Theorie zu überprüfen, müssen in Zukunft zahlreiche Mutationsanalysen in Ziliopathie-Patienten durchgeführt werden.

6.3 Die Funktion von Rpgrip1l in der Regulation zellulärer

Proteindegradationsprozesse

Neben der Funktion von Rpgrip1l in der TZ-Assemblierungshierarchie von Vertebraten, konnte gezeigt werden, dass Rpgrip1l in der Lage ist die zwei Hauptprozesse der zellulären Proteindegradation zu regulieren. So werden sowohl das UPS als auch die Autophagie von Rpgrip1l positiv reguliert (Gerhardt et al., 2015; Struchtrup et al., 2018; Wiegering et al., 2018b).

Aufgrund der Beobachtung, dass *Rpgrip1l*-defiziente Mausembryonen in verschiedenen Organen eine gestörte Hh-Signalgebung aufweisen, die auf einer reduzierten Prozessierung des Gli3-Proteins beruht (Besse et al., 2011; Gerhardt et al., 2013; Laclef et al., 2015; Vierkotten et al., 2007), wurde eine Verbindung zwischen Rpgrip1l und dem Proteasom vermutet. Mit Hilfe von Interaktionsstudien konnte daraufhin gezeigt werden, dass das Proteasom über seine 19S-Untereinheit Psmd2 mit der RID C2 von Rpgrip1l interagiert und diese Interaktion direkt an der ziliären Basis stattfindet (Gerhardt et al., 2015). Das Proteasom wird hierbei positiv von Rpgrip1l reguliert und realisiert die Prozessierung der Gli-Proteine innerhalb der Hh-Signalgebung (Gerhardt et al., 2015; Schrader et al., 2011; Wang et al., 2000) (siehe 3.1.4). Unter *Rpgrip1l*-Defizienz ist die proteasomale Aktivität an der ziliären Basis reduziert, sodass die Prozessierung der Gli-Proteine gestört ist. Die gesamtzelluläre

proteasomale Aktivität bleibt jedoch unverändert (Gerhardt et al., 2015; Gerhardt et al., 2016b). Damit zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen der Funktion von Rpgrip1l und anderen ziliären Proteinen, die ebenfalls Einfluss auf das Proteasom nehmen. So führt der Verlust oder die Reduktion von Bbs4, Bbs7 und Ofd1 zu einer Reduktion der gesamtzellulären proteasomalen Aktivität (Gascue et al., 2012; Gerdes et al., 2007; Liu et al., 2014). Desweiteren zeigt die Reduktion der proteasomalen Aktivität unter *Rpgrip1l*-Defizienz, dass an der ziliären Basis ein spezifisches Proteasom existiert, welches individuell reguliert wird (Gerhardt et al., 2015; Wiegering et al., 2018b). Die daraus resultierenden Störungen der Hh-Signalgebung variieren von Organ zu Organ und können entweder hoch- oder herunterreguliert vorliegen (Besse et al., 2011; Gerhardt et al., 2013; Vierkotten et al., 2007). Neben dem Hh-Signalweg werden weitere Signalkaskaden wie der Notch-, Wnt-, Pdgfra- oder der Tgfβ-Signalweg durch Zilien vermittelt und ebenfalls vom Proteasom beeinflusst (Corbit et al., 2008; Fukuchi et al., 2001; Gerdes et al., 2007; Lo und Massagué, 1999; Matei et al., 2007; McGill und McGlade, 2003; Öberg et al., 2001). Somit liegt die Vermutung nahe, dass Rpgrip1l in der Lage ist neben dem Hh-Signalweg auch diese Signalwege zu beeinflussen. Für den Pdgfra-Signalweg konnte bereits gezeigt werden, dass er unter *Rpgrip1l*-Defizienz in embryonalen Herzen stark reduziert vorliegt und dies zur Ausbildung von VSDs in *Rpgrip1l*-negativen Embryonen führt. Hierbei kann die Reduktion der Pdgfra-Signalgebung auf die verminderte Hh-Zielgenexpression zurückgeführt werden, die bei einer *Rpgrip1l*-Defizienz im Herzen vorliegt (Gerhardt et al., 2013; Wiegering et al., 2017). Berücksichtigt man aber die Tatsache, dass der Pdgfra-Signalweg auch vom Proteasom beeinflusst werden kann, ergibt sich die Möglichkeit einer Hh-unabhängigen Regulation der Pdgfra-Signalkaskade durch Rpgrip1l und das ziliäre Proteasom (Gerhardt et al., 2016a). Neben der Funktion des zilienregulierten Proteasoms in der Herzentwicklung, könnten auch andere Organdefekte der *Rpgrip1l*^{-/-}-Embryonen durch die reprimierte Aktivität des ziliären Proteasoms verursacht werden. Um dies zu prüfen, wurden zunächst *in vitro* und *ex vivo* Studien durchgeführt, in denen MEFs oder Embryonen mit SFN behandelt wurden (Gerhardt et al., 2015). SFN ist ein sekundärer Pflanzenstoff der vor allem in Brokoli vorkommt und ein starkes Antioxidans

darstellt (Juge et al., 2007). Durch die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs ist SFN in der Lage die proteasomale Aktivität zu steigern (Kwak et al., 2007; Kwak et al., 2003). Aus diesem Grund wird SFN bereits in klinischen Studien zur Behandlung von Schizophrenie, Autismus, Diabetes und Tumorerkrankungen genutzt und konnte hier vielversprechende Resultate erzielen (Bahadoran et al., 2012; Bauman et al., 2016; Shiina et al., 2015; Singh et al., 2014). Die *in vitro* Behandlung der MEFs und *ex vivo* Behandlung der murinen Embryonen konnte zeigen, dass SFN die proteasomale Aktivität an der ziliären Basis *Rpgrip11*-negativer MEFs und Embryonen wiederherstellen kann. Die veränderte Zilienlänge der *Rprip11*^{-/-}-MEFs und Embryonen wurde durch die SFN-Behandlung allerdings nicht gerettet (Gerhardt et al., 2015), was dafür sprechen könnte, dass die sensorische Funktion der Zilien durch eine SFN-Behandlung nicht wiederhergestellt werden kann. Nichtsdestotrotz könnte die Behandlung mit SFN eine gute Therapiemöglichkeit zur Behandlung von Ziliopathien darstellen, da zumindest die Defekte, welche durch die reduzierte proteasomale Aktivität an der ziliären Basis verursacht werden, auf diese Weise kuriert werden könnten.

Eine reduzierte proteasomale Aktivität kann unter Normalbedingungen durch eine Erhöhung der autophagischen Aktivität aufgefangen werden, sodass eine Art Sicherheitsmechanismus zwischen den zwei Proteindegradationssystemen besteht. Die Aktivitätsänderung des einen Systems führt hierbei zu einer entgegengesetzten Aktivitätsregulation des zweiten Systems (Levine und Kroemer, 2008; Lilienbaum, 2013) (siehe 3.4). Es stellt sich folglich die Frage, ob durch die Reduktion der proteasomalen Aktivität in *Rpgrip11*-negativen Zellen und Mäusen die Aktivität der Autophagie erhöht wird. Aufgrund der vielfältigen Defekte der *Rpgrip11*^{-/-}-Embryonen ist eine vollständige Kompensation der reduzierten proteasomalen Aktivität durch eine Erhöhung der Autophagie unwahrscheinlich. Eine Analyse der autophagischen Aktivität in MEFs zeigt, dass diese unter *Rpgrip11*-Defizienz reduziert vorliegt (Struchtrup et al., 2018). So weisen *Rpgrip11*^{-/-}-MEFs im Vergleich zu *Rpgrip11*^{+/+}-MEFs eine deutlich verringerte Anzahl an Autophagosomen auf, die mit Hilfe von Atg5 oder Lc3 markiert wurden. Zudem ist der autophagische Flux in den *Rpgrip11*-negativen Zellen signifikant reduziert. Der autophagische Flux ist eine Methode, mit der die autophagische Aktivität eindeutiger bestimmt werden kann

als mit der Färbung der Autophagosomen allein. So könnten die reduzierten Mengen von Atg5- und Lc3-positiven Autophagosomen in den *Rpgrip1l*-negativen Zellen als verminderte oder erhöhte Autophagie-Aktivität interpretiert werden. Einerseits können die reduzierten Mengen direkt auf eine reduzierte Anzahl von Autophagosomen hindeuten. Andererseits kann eine erhöhte Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen zu einem lysosomalen Abbau der Autophagosomen führen. Somit wären weniger Autophagosomen bei erhöhter autophagischer Aktivität zu beobachten. Um dieses Interpretationsproblem zu umgehen, wird der autophagische Flux verwendet (Tanida et al., 2005). Hierbei behandelt man Zellen mit spezifischen Drogen, die in den Autophagie-Prozess eingreifen. Zum Beispiel lässt sich mit der Droge Chloroquin (CQ) die Fusion der Lysosomen mit den Autophagosomen und der lysosomale Proteinabbau verhindern (Towers und Thorburn, 2016). Behandelt man *Rpgrip1l^{+/+}*- und *Rpgrip1l^{-/-}*-MEFs mit CQ und analysiert die Menge an Lc3, lässt sich in den negativen Zellen kein Unterschied zu den Lc3-Mengen der unbehandelten MEFs feststellen. Im Wildtyp hingegen ist ein Anstieg an Lc3 zu beobachten, was durch die Inhibition der Autolysosom-Formation zu erklären ist. Insgesamt zeigt das Ergebnis, dass in den *Rpgrip1l*-negativen MEFs tatsächlich eine reduzierte autophagische Aktivität vorliegt (Struchtrup et al., 2018). Neben dem autophagischen Flux bestätigen auch Quantifizierungen der Autophagie-assoziierten Proteine Ofd1 und Bbs4 die Reduktion der autophagischen Aktivität in *Rpgrip1l*-defizienten MEFs. Ofd1 wird mit Hilfe der Autophagie an der ziliären Basis abgebaut (Tang et al., 2013) und akkumuliert in homozygot mutanten *Rpgrip1l*-MEFs. Im Gegensatz dazu wird Bbs4 mit Hilfe der Autophagie zur ziliären Basis rekrutiert (Tang et al., 2013). Diese Rekrutierung ist in *Rpgrip1l^{-/-}*-MEFs gestört, sodass weniger Bbs4 an der Basis der Zilie zu finden ist. Da Autophagie durch mTorc1 negativ reguliert wird, wurde im Folgenden die Menge an phosphoryliertem und somit aktiviertem mTor in wildtypischen und *Rpgrip1l*-negativen MEFs analysiert. Es zeigt sich, dass eine erhöhte Menge an phosphoryliertem mTor an der ziliären Basis der *Rpgrip1l*-negativen MEFs vorliegt. Zudem konnte eine erhöhte Menge an aktivem Akt entlang der Zilie in *Rpgrip1l^{-/-}*-MEFs nachgewiesen werden. Somit reguliert *Rpgrip1l* die autophagische Aktivität mittels Akt und mTorc1. Bei *Rpgrip1l*-Defizienz wird die

Akt-Phosphorylierung nicht inhibiert und die erhöhte Menge an aktivem Akt führt zur Phosphorylierung von mTor, was wiederum die Autophagie inhibiert (Struchtrup et al., 2018). Die genauen Mechanismen, durch die Rpgrip1l die Phosphorylierung von Akt vermittelt, müssen hierbei noch untersucht werden. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten frühere Studien zeigen, dass eine gestörte Ziliogenese zu einer reduzierten Autophagie aufgrund einer aktivierten mTor-Signalgebung führt (Wang et al., 2015). Desweiteren lässt sich feststellen, dass die autophagische Aktivität durch die Hh-Signalgebung reguliert werden kann (Pampliega et al., 2013). Die Rettung der gestörten Hh-Signalgebung in den *Rpgrip1l*-negativen MEFs durch die Überexpression von *Gli1* zeigt allerdings, dass die reduzierte autophagische Aktivität nicht wiederhergestellt werden kann. Somit reguliert Rpgrip1l Autophagie unabhängig von der Hh-Signalgebung (Struchtrup et al., 2018). Dies wird auch deutlich, wenn man die *Rpgrip1l*-negativen MEFs mit Rapamycin behandelt. Rapamycin wirkt als mTor-Inhibitor und steigert dadurch die autophagische Aktivität (Heitman et al., 1991; Helliwell et al., 1994; Kunz et al., 1993). In Mutanten, in denen das Hh-Signalnetzwerk gestört ist und es dadurch zu einer Reduktion der Autophagie kommt, kann Rapamycin die autophagische Aktivität nicht retten (Pampliega et al., 2013). Demgegenüber zeigt die Behandlung der *Rpgrip1l*^{-/-}-MEFs in unseren Analysen, dass sowohl die autophagische Aktivität als auch die veränderte Zilienlänge durch die Behandlung mit Rapamycin gerettet wird (Struchtrup et al., 2018). Somit könnte hier nicht nur die Autophagie, sondern auch die Funktion der gesamten Zilie im Bezug auf ihre sensorische Funktion wiederhergestellt sein. Dieser Zusammenhang muss in Zukunft detaillierter untersucht werden. Insgesamt zeigen unsere Analysen, dass Ziliopathien, die auf einer *Rpgrip1l*-Mutation beruhen, neben einer SFN- auch durch eine Rapamycin-Behandlung kuriert werden könnten.

6.4 Die verschiedenen Funktionen von Rpgrip1l und daraus resultierende Behandlungsstrategien für Ziliopathien

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Hauptfunktionen von Rpgrip1l detailliert beschrieben. Neben der bereits bekannten Funktion als positiver Regulator des ziliären Proteasoms (Gerhardt et al., 2015) (siehe 3.4.1 und 6.3) wurde gezeigt, dass auch Autophagie positiv von Rpgrip1l reguliert wird (Struchtrup et al., 2018) (siehe 6.3). Zusätzlich wurde die Schlüsselrolle, die Rpgrip1l in der TZ-Assemblierungshierarchie von Wirbeltieren spielt, analysiert. Hierbei konnten deutliche Unterschiede zum Modell der TZ-Assemblierung in *C. elegans* gezeigt werden (Wiegering et al., 2018a) (siehe 6.2). Neben den drei Hauptfunktionen von Rpgrip1l in der Entwicklung von Wirbeltieren wurden zudem mögliche Funktionen von Rpgrip1l in der Homöostase eines Organismus diskutiert (Wiegering et al., 2018b). So wird angenommen, dass Rpgrip1l durch seine Interaktion mit Mad2 als Tumorsuppressor wirkt (Lin et al., 2009). Außerdem wurde eine Verbindung zwischen Rpgrip1l und Myosin Va gezeigt, durch die Prozesse wie Ziliogenese, Zell-Migration und Proliferation kontrolliert werden können (Assis et al., 2017). Auch eine Verbindung von Rpgrip1l und der Ausbildung von Fettleibigkeit konnte nachgewiesen werden (Stratigopoulos et al., 2016; Stratigopoulos et al., 2011; Stratigopoulos et al., 2014). Interessanterweise könnten diese Funktionen von Rpgrip1l mit der Regulation des Proteasoms oder der Autophagie in Verbindung stehen (Gerhardt et al., 2016a; Wiegering et al., 2018b).

Generell werden die beiden Proteindegradationsprozesse UPS und Autophagie unabhängig voneinander durch Rpgrip1l reguliert (Struchtrup et al., 2018). Ob Rpgrip1l die TZ-Assemblierung und damit ziliäre Funktionalität ebenfalls unabhängig reguliert oder hier eine Schnittstelle der Funktionen von Rpgrip1l besteht, ist bisher nicht geklärt und bedarf weiterer Analysen. Da neben der Autophagie auch die Zilienlänge in *Rpgrip1l*-negativen MEFs durch die Behandlung mit Rapamycin gerettet wird, könnte hier eventuell eine Schnittstelle der Funktionen von Rpgrip1l in der Regulation der Autophagie und der Regulation der TZ-Assemblierung vorliegen. Im Gegensatz dazu wird die Zilienlänge der *Rpgrip1l*-negativen MEFs durch SFN nicht gerettet, sodass eine Schnittstelle der Funktionen von Rpgrip1l hier

unwahrscheinlicher erscheint. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Zilien wildtypischer MEFs durch eine Behandlung mit Mg132, einem Proteasomen-Inhibitor, verlängert vorliegen (Gerhardt et al., 2015). Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der proteasomalen Aktivität und ziliären Funktion bestehen. Ob hierbei jedoch Rpgrip1l als Schnittstelle fungiert, bleibt abzuwarten.

Unabhängig der Verbindungen zwischen der Regulation von proteasomaler Aktivität, Autophagie und TZ-Assemblierung, lassen sich durch die vorliegenden Analysen Behandlungsmöglichkeiten für Ziliopathien, die auf einer *RPGRIP1L*-Mutation beruhen, entwickeln. Diese wären zunächst im Ziliopathie-Mausmodell (*Rpgrip1l*-mutante Mäuse) zu testen und könnten später zu einer klinischen Studie ausgeweitet werden. Erfolgsversprechend wäre hierbei eine Therapie aus kombinierter SFN- und Rapamycin-Injektion während der Schwangerschaft. Im Idealfall könnte durch diese Therapie die Reduktion der proteasomalen sowie der autphagischen Aktivität und die damit zusammenhängenden Entwicklungsdefekte gerettet werden. Um genauer zu definieren welche Defekte auf einer reduzierten Autophagie und/oder einer reduzierten proteasomalen Aktivität beruhen, sollten zudem Einzelbehandlungen mit SFN oder Rapamycin durchgeführt werden. Hierbei könnte zusätzlich der Einfluss der Proteindegradationsprozesse auf die TZ-Assemblierung analysiert werden. Desweiteren könnten zusätzlich zu SFN und Rapamycin andere Proteasom- und Autophagie-Aktivatoren eingesetzt werden.

Neben Mutationen in *Rpgrip1l* führen auch Mutationen vieler anderer Gene, die für TZ-Proteine kodieren, zur Ausbildung verschiedener Ziliopathien (Czarnecki und Shah, 2012; Hildebrandt et al., 2011). Hierbei unterscheiden sich die einzelnen Ziliopathie-Syndrome in ihrem Schweregrad voneinander und obwohl die Mutationen verschiedener Gene zu gleich schweren und lebensbedrohlichen Syndromen führen können, gibt es auch Gene, deren Mutation ausschließlich zur Ausbildung schwächerer Ziliopathie-Syndrome führt (Álvarez-Satta et al., 2015; Hildebrandt et al., 2011; Waters und Beales, 2011). Hier stellt sich die Frage, worauf dieser gravierende Unterschied des Ausprägungsgrads von Ziliopathien bei Mutationen unterschiedlicher Gene begründet ist. Eine Möglichkeit ist, dass neben Rpgrip1l

auch andere TZ-Proteine in der Lage sind, die proteasomale und autophagische Aktivität zu regulieren und/oder eine hohe Position in der TZ-Assemblierungshierarchie einnehmen. Eine Mutation dieser Gene könnte ähnlich wie eine *RPGRIP1L*-Mutation zur Ausbildung starker, lebensbedrohlicher Ziliopathie-Syndrome führen. Im Gegensatz dazu könnten schwache Ziliopathien durch Mutationen solcher Gene ausgelöst werden, die innerhalb der TZ-Assemblierung nur eine untergeordnete Funktion ausüben und das Proteasom und die Autophagie nicht beeinflussen. Um diese Hypothese zu prüfen sollten Vergleiche der proteasomalen und autophagischen Aktivität sowie Zelltyp-spezifische Funktionsanalysen verschiedener TZ-Proteine in Modell-Mäusen für schwache, nicht lebensbedrohliche Ziliopathien und starke, lebensbedrohliche Ziliopathien durchgeführt werden. Hierbei könnte sich zeigen, ob *Rpgrip1l* das einzige TZ-Protein ist, welches multiple Funktionen an der TZ ausübt. Zusätzlich könnten durch diese Analysen gänzlich neue Funktionen von TZ-Proteinen aufgedeckt werden, mit deren Hilfe kurative Therapien für Ziliopathie-Patienten entwickelt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Afzelius, B.** (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **193**, 317-319.
- Al-Bhalal, L. und Akhtar, M.** (2005). Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv. Anat. Pathol.* **12**, 126-133.
- Álvarez-Satta, M., Castro-Sánchez, S. und Valverde, D.** (2015). Alström syndrome: current perspectives. *Appl. Clin. Genet.* **8**, 171-179.
- Anderson, R.** (1972). The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *J. Cell Biol.* **54**, 246-265.
- Andrade, Y., Fernandes, J., Vázquez, E., Fernández-Fernández, J., Arniges, M., Sánchez, T., Villalón, M. und Valverde, M.** (2005). TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J Cell Biol.* **168**, 869-874.
- Apfeld, J. und Kenyon, C.** (1999). Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **402**, 804-809.
- Arts, H., Doherty, D., van Beersum, S., Parisi, M., Letteboer, S., Gorden, N., Peters, T., Märker, T., Voeselek, K., Kartono, A., et al.** (2007). Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat. Genet.* **39**, 882-888.
- Assis, L., Silva-Junior, R., Dolce, L., Alborghetti, M., Honorato, R., Nascimento, A., Melo-Hanchuk, T., Trindade, D., Tonoli, C., Santos, C., et al.** (2017). The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L. *Sci. Rep.* **7**, 43692.
- Astorga, J. und Carlsson, P.** (2007). Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4. *Development* **134**, 3753-3761.
- Avidor-Reiss, T. und Leroux, M.** (2015). Shared and distinct mechanisms of compartmentalized and cytosolic ciliogenesis. *Curr Biol.* **25**, R1143-R1150.
- Bae, Y. und Barr, M.** (2008). Sensory roles of neuronal cilia: cilia development, morphogenesis, and function in *C. elegans*. *Front. Biosci.* **13**, 5959-5974.
- Bahadoran, Z., Tohidi, M., Nazeri, P., Mehran, M., Azizi, F. und Mirmiran, P.** (2012). Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind clinical trial. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 767-771.
- Bai, C., Auerbach, W., Lee, J., Stephen, D. und Joyner, A.** (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* **129**, 4753-4761.
- Bangs, F. und Anderson, K.** (2017). Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, pii: a028175.
- Bansal, M., Moharir, S. und Swarup, G.** (2018). Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Commun. Integr. Biol.* **11**, 1-4.
- Basiri, M., Ha, A., Chadha, A., Clark, N., Polyanovsky, A., Cook, B. und Avidor-Reiss, T.** (2014). A migrating ciliary gate compartmentalizes the site of axoneme assembly in *Drosophila* spermatids. *Curr. Biol.* **24**, 2622-2631.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C., Khodjakov, A. und Raff, J.** (2006). Flies without centrioles. *Cell* **125**, 1375-1386.
- Bauman, J., Zang, Y., Sen, M., Li, C., Wang, L., Egner, P., Fahey, J., Normolle, D., Grandis, J., Kensler, T., et al.** (2016). Prevention of Carcinogen-Induced Oral Cancer by Sulforaphane. *Cancer Prev. Res. (Phila).* **9**, 547-557.
- Benzing, T. und Schermer, B.** (2011). Transition zone proteins and cilia dynamics. *Nat. Genet.* **43**, 723-724.

- Bernhard, W. und deHarven, E.** (1960). L'ultrastructure du centriole et d'autres éléments de l'appareil achromatique. *Bargmann W., Peters D., Wolpers C. (eds) Verhandlungen Band II / Biologisch-Medizinischer Teil. 2*, 218-227.
- Besse, L., Neti, M., Anselme, I., Gerhardt, C., Rütther, U., Laclef, C. und Schneider-Maunoury, S.** (2011). Primary cilia control telencephalic patterning and morphogenesis via Gli3 proteolytic processing. *Development* **138**, 2079-2088.
- Betleja, E. und Cole, D.** (2010). Ciliary trafficking: CEP290 guards a gated community. *Curr. Biol.* **20**, R928-931.
- Bjørkøy, G., Lamark, T. und Johansen, T.** (2006). p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* **2**, 138-139.
- Bloodgood, R.** (2009). From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. The primary cilium. *Methods in Cell Biology* **94**, 2-52.
- Booij, J., Florijn, R., ten Brink, J., Loves, W., Meire, F., van Schooneveld, M., de Jong, P. und Bergen, A.** (2005). Identification of mutations in the AIPL1, CRB1, GUCY2D, RPE65, and RPGRIP1 genes in patients with juvenile retinitis pigmentosa. *J. Med. Genet.* **42**, e67.
- Boylan, J. und Wright, A.** (2000). Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2085-2093.
- Brickner, M., Hillis, L. und Lange, R.** (2000). Congenital heart disease in adults. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **342**, 256-263.
- Briscoe, J. und Théron, P.** (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 416-429.
- Brooks, P., Fuentes, G., Murray, R., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M., Hendil, K., Tanaka, K., Dyson, J. und Rivett, J.** (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.* **346**, 155-161.
- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J. und Bettencourt-Dias, M.** (2011). Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J. Cell Biol.* **194**, 165-175.
- Castresana, J.** (2015). Cancer as a Ciliopathy: The Primary Cilium as a New Therapeutic Target. *J. Carcinog. Mutagene* **6**, e119.
- Chávez, M., Ena, S., Van Sande, J., de Kerchove d'Exaerde, A., Schurmans, S. und Schiffmann, S.** (2015). Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output. *Dev. Cell* **34**, 338-350.
- Chen, J., Laclef, C., Moncayo, A., Snedecor, E., Yang, N., Li, L., Takemaru, K., Paus, R., Schneider-Maunoury, S. und Clark, R.** (2015). The ciliopathy gene Rpgrip1l is essential for hair follicle development. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 701-709.
- Chen, M., Wilson, C., Li, Y., Law, K., Lu, C., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C. und Chuang, P.** (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* **23**, 1910-1928.
- Chen, Y. und Klionsky, D.** (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161-170.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E. und Young KE, C. J., Westphal H, Beachy PA.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.
- Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L., Hass, P., Sandoval, W. und 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. und Satir, P.** (2007). Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic.* **8**, 97-109.

- Ciechanover, A. und Brundin, P.** (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. **40**, 427-446.
- Coene, K., Mans, D., Boldt, K., Gloeckner, C., van Reeuwijk, J., Bolat, E., Roosing, S., Letteboer, S., Peters, T., Cremers, F., et al.** (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.
- Corbit, K., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A., Stainier, D. und Reiter, J.** (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-1021.
- Corbit, K., Shyer, A., Dowdle, W., Gauden, J., Singla, V., Chen, M., Chuang, P. und 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. und Goldberg, A.** (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- Craige, B., Tsao, C., Diener, D., Hou, Y., Lehtreck, K., Rosenbaum, J. und Witman, G.** (2010). CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J. Cell Biol.* **190**, 927-940.
- Cui, C., Chatterjee, B., Francis, D., Yu, Q., SanAgustin, J., Francis, R., Tansey, T., Henry, C., Wang, B., Lemley, B., et al.** (2011). Disruption of Mks1 localization to the mother centriole causes cilia defects and developmental malformations in Meckel-Gruber syndrome. *Dis. Model. Mech.* **4**, 43-56.
- Czarnecki, P. G. und Shah, J. V.** (2012). The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends in Cell Biol.* **22**, 201-210.
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M. und Ishii, S.** (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* **274**, 8143-8152.
- Dawe, H., Smith, U., Cullinane, A., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., et al.** (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. und 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., et al.** (2007). The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat. Genet.* **39**, 875-881.
- Dikic, I.** (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 193-224.
- Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J. und Hui, C.** (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* **125**, 2533-2543.
- Dobell, C.** (1932). *Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals"*. New York: Harcourt, Brace and Co.

- Doherty, D., Parisi, M., Finn, L., Gunay-Aygun, M., Al-Mateen, M., Bates, D., Clericuzio, C., Demir, H., Dorschner, M., van Essen, A., et al. (2010). Mutations in 3 genes (MKS3, CC2D2A and RPGRIP1L) cause COACH syndrome (Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis). *J. Med. Genet.* **47**, 8-21.
- Dowdle, W., Robinson, J., Kneist, A., Sirerol-Piquer, M., Frints, S., Corbit, K., Zaghloul, N., van Lijnschoten, G., Mulders, L., Verver, D., et al. (2011). Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 94-110.
- Dryja, T., Adams, S., Grimsby, J., McGee, T., Hong, D., Li, T., Andréasson, S. und Berson, E. (2001). Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 1295-1298.
- DuJardin, F. (1841). Histoire Naturelle des Zoophytes (Infusoires). *Librarie Encyclopédique de Roret, Paris*, 1-684.
- Echelard, Y., Epstein, D., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. und 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.
- Eggenchwiler, J. und Anderson, K. (2007). Cilia and developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 345-373.
- Elsasser, S., Gali, R., Schwickart, M., Larsen, C., Leggett, D., Müller, B., Feng, M., Tübing, F., Dittmar, G. und Finley, D. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat. Cell Biol.* **4**, 725-730.
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V. und Jessell, T. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **62**, 451-466.
- Fernandes, J., Lorenzo, I., Andrade, Y., Garcia-Elias, A., Serra, S., Fernández-Fernández, J. und Valverde, M. (2008). IP3 sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5'-6'-epoxyeicosatrienoic acid. *J. Cell Biol.* **181**, 143-155.
- Ferreira, A., Shenoy, V., Yamazato, Y., Sriramula, S., Francis, J., Yuan, L., Castellano, R., Ostrov, D., Oh, S., Katovich, M., et al. (2009). Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 1048-1054.
- Fisch, C. und Dupuis-Williams, P. (2011). Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biol. Cell.* **103**, 249-270.
- Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J. und Rütter, U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature.* **458**, 894-898.
- Flemming, W. (1875). Studien über die Entwicklungsgeschichte der Najaden. *Sitzungsgeb. Akad. Wiss. Wien* **71**, 125-143.
- Fliegauf, M., Benzing, T. und Ocran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 880-893.
- Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K. und Miyazono, K. (2001). Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1431-1443.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J., Cecconi, F., Cho, i. A., Chu, C., Codogno, P., Colombo, M., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 11811-11836.
- Garcia-Gonzalo, F., Corbit, K., Sirerol-Piquer, M., Ramaswami, G., Otto, E., Noriega, T., Seol, A., Robinson, J., Bennett, C., Josifova, D., et al. (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat. Genet.* **43**, 776-784.

- Garcia-Gonzalo, F., Phua, S., Roberson, E., Garcia, G. r., Abedin, M., Schurmans, S., Inoue, T. und Reiter, J.** (2015). Phosphoinositides Regulate Ciliary Protein Trafficking to Modulate Hedgehog Signaling. *Dev. Cell* **34**, 400-409.
- Gascue, C., Tan, P., Cardenas-Rodriguez, M., Libisch, G., Fernandez-Calero, T., YP, L., Astrada, S., Robello, C., Naya, H., Katsanis, N., et al.** (2012). Direct role of Bardet-Biedl syndrome proteins in transcriptional regulation. *J. Cell Sci.* **125**, 362-375.
- Gerber, S., Perrault, I., Hanein, S., Barbet, F., Ducroq, D., Ghazi, I., Martin-Coignard, D., Leowski, C., Homfray, T., Dufier, J., et al.** (2001). Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur. J. Hum. Genet.* **9**, 561-571.
- Gerdes, J., Davis, E. und Katsanis, N.** (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**, 32-45.
- Gerdes, J., Liu, Y., Zaghoul, N., Leitch, C., Lawson, S., Kato, M., Beachy, P., Beales, P., DeMartino, G., Fisher, S., et al.** (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat. Genet.* **39**, 1350-1360.
- Gerhardt, C., Leu, T., Lier, J. und Rütger, U.** (2016a). The cilia-regulated proteasome and its role in the development of ciliopathies and cancer. *Cilia* **5**, 14.
- Gerhardt, C., Lier, J., Burmühl, S., Struchtrup, A., Deutschmann, K., Vetter, M., Leu, T., Reeg, S., Grune, T. und Rütger, U.** (2015). The transition zone protein Rpgrip11 regulates proteasomal activity at the primary cilium. *J. Cell Biol.* **210**, 115-133.
- Gerhardt, C., Lier, J., Kuschel, S. und Rütger, U.** (2013). The ciliary protein Ftm is required for ventricular wall and septal development. *PLoS One* **8**, e57545.
- Gerhardt, C., Wiegeling, A., Leu, T. und Rütger, U.** (2016b). Control of Hedgehog signalling by the cilia-regulated proteasome. *J. Dev. Biol.* **4**, 27.
- Gibbons, I. und Grimstone, A.** (1960). On flagellar structure in certain flagellates. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 697-716.
- Gilula, N. und Satir, P.** (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J. Cell Biol.* **53**, 494-509.
- Goetz, S. und Anderson, K.** (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 331-344.
- Goetz, S., Bangs, F., Barrington, C., Katsanis, N. und Anderson, K.** (2017). The Meckel syndrome- associated protein MKS1 functionally interacts with components of the BBSome and IFT complexes to mediate ciliary trafficking and hedgehog signaling. *PLoS One.* **12**, e0173399.
- Gómez-Sánchez, R., Rose, J., Guimarães, R., Mari, M., Papinski, D., Rieter, E., Geerts, W., Hardenberg, R., Kraft, C., Ungermann, C., et al.** (2018). Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J. Cell Biol.* **217**, 2743-2763.
- Gomez, T., Kolawa, N., Gee, M., Sweredoski, M. und 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.
- Gonçalves, J. und Pelletier, L.** (2017). The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. *Mol. Cells* **40**, 243-253.
- Gorden, N., Arts, H., Parisi, M., Coene, K., Letteboer, S., van Beersum, S., Mans, D., Hikida, A., Eckert, M., Knutzen, D., et al.** (2008). CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 559-571.

- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. und Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471.
- Guo, C., Liu, G., Xiong, S., Ge, F., Fuse, T., Wang, Y. und Kitazato, K. (2011). The C-terminus of MIP-T3 protein is required for ubiquitin-proteasome-mediated degradation in human cells. *FEBS Lett.* **585**, 1350-1356.
- Hamacher-Brady, A. (2012). Autophagy regulation and integration with cell signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 756-765.
- Hameed, A., Abid, A., Aziz, A., Ismail, M., Mehdi, S. und Khaliq, S. (2003). Evidence of RPGRIP1 gene mutations associated with recessive cone-rod dystrophy. *J. Med. Genet.* **40**, 616-619.
- Hatton, B., Knoepfler, P., Kenney, A., Rowitch, D., de Alborán, I., Olson, J. und Eisenman, R. (2006). N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res.* **66**, 8655-8661.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. und Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1433-1437.
- He, X. (2008). Cilia put a brake on Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* **10**, 11-13.
- Heitman, J., Movva, N. und Hall, M. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909.
- Helliwell, S., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R. und Hall, M. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* **5**, 105-118.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479.
- Hildebrandt, F., Attanasio, M. und Otto, E. (2009). Nephronophthisis: Disease Mechanisms of a Ciliopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 23-35.
- Hildebrandt, F., Benzing, T. und Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1533-1543.
- Hoffman, J. und Kaplan, S. (2002). The incidence of congenital heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1890-1900.
- Hong, D., Yue, G., Adamian, M. und Li, T. (2001). Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J. Biol. Chem.* **276**, 12091-12099.
- Hou, Y., Pazour, G. und Witman, G. (2004). A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4382-4394.
- Huang, L., Szymanska, K., Jensen, V., Janecke, A., Innes, A., Davis, E., Frosk, P., Li, C., Willer, J., Chodirker, B., et al. (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.
- Humke, E., Dorn, K., Milenkovic, L., Scott, M. und 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.
- Inaba, K. und Mizuno, K. (2015). Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod. Med. Biol.* **15**, 77-94.
- Ingham, P. und McMahon, A. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059-3087.
- Ingham, P., Nakano, Y. und Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 393-406.

- Inglis, P., Ou, G., Leroux, M. und Scholey, J. (2007). The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1-22.
- Iomini, C., Babaev-Khaimov, V., Sassaroli, M. und Piperno, G. (2001). Protein particles in *Chlamydomonas* flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J. Cell Biol.* **153**, 13-24.
- Isakson, P., Holland, P. und Simonsen, A. (2013). The role of ALFY in selective autophagy. *Cell Death Differ.* **20**, 12-20.
- Ishikawa, H. und Marshall, W. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 222-234.
- Ishikawa, H. und Marshall, W. (2017). Intraflagellar Transport and Ciliary Dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a021998.
- Jana, S., Mendonça, S., Machado, P., Werner, S., Rocha, J., Pereira, A., Maiato, H. und Bettencourt-Dias, M. (2018). Differential regulation of transition zone and centriole proteins contributes to ciliary base diversity. *Nat. Cell Biol.* **20**, 928-941.
- Jauregui, A., Nguyen, K., Hall, D. und Barr, M. (2008). The *Caenorhabditis elegans* nephrocystins act as global modifiers of cilium structure. *J. Cell Biol.* **180**, 973-988.
- Jennings, H. (1906). Behavior of the Lower Organisms. *Columbia University Press, New York*, 47-49.
- Jensen, V., Li, C., Bowie, R., Clarke, L., Mohan, S., Blacque, O. und Leroux, M. (2015). Formation of the transition zone by Mks5/Rpgrip1L establishes a ciliary zone of exclusion (CIZE) that compartmentalises ciliary signalling proteins and controls PIP2 ciliary abundance. *EMBO J.* **34**, 2537-2556.
- Johansen, T. und Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279-296.
- Juge, N., Mithen, R. und Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1105-1127.
- Jung, C., SH, R., J, C., Otto, N. und Kim, D. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1287-1295.
- Kang, R., Zeh, H., Lotze, M. und Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* **18**, 571-580.
- Kartagener, M. (1933). Zur Pathogenese der Bronchiektasien. I. Bronchiektasien bei Situs inversus viscerum. *Beitr. Klin. Tuberk.* **83**, 489-501.
- Kasahara, K., Kawakami, Y., Kiyono, T., Yonemura, S., Kawamura, Y., Era, S., Matsuzaki, F., Goshima, N. und Inagaki, M. (2014). Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension. *Nat. Commun.* **5**, 5081.
- Kayed, H., Kleeff, J., Keleg, S., Büchler, M. und Friess, H. (2003). Distribution of Indian hedgehog and its receptors patched and smoothed in human chronic pancreatitis. *J. Endocrinol.* **178**, 467-478.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. und Guan, K. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132-141.
- Koefoed, K., Veland, I., Pedersen, L., Larsen, L. und Christensen, S. (2014). Cilia and coordination of signaling networks during heart development. *Organogenesis* **10**, 108-125.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y. und Ciechanover, A. (2012). Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J. Cell Sci.* **125**, 539-548.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. und Hall, M. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* **73**, 585-596.

- Kwak, M., Cho, J., Huang, B., Shin, S. und Kensler, T.** (2007). Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 809-817.
- Kwak, M., Wakabayashi, N., Greenlaw, J., Yamamoto, M. und Kensler, T.** (2003). Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8786-8794.
- La Torre, M., Merigliano, C., Burla, R., Mottini, C., Zanetti, G., Del Giudice, S., Carcuro, M., Virdia, I., Bucciarelli, E., Manni, I., et al.** (2018). Mice with reduced expression of the telomere-associated protein Ft1 develop p53-sensitive progeroid traits. *Aging Cell*, e12730. [Epub ahead of print].
- Laclef, C., Anselme, I., Besse, L., Catala, M., Palmyre, A., Baas, D., Paschaki, M., Pedraza, M., Métin, C., Durand, B., et al.** (2015). The role of primary cilia in corpus callosum formation is mediated by production of the Gli3 repressor. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 4997-5014.
- Lambacher, N., Bruel, A., van Dam, T., Szymańska, K., Slaats, G., Kuhns, S., McManus, G., Kennedy, J., Gaff, K., Wu, K., et al.** (2016). TMEM107 recruits ciliopathy proteins to subdomains of the ciliary transition zone and causes Joubert syndrome. *Nat. Cell Biol.* **18**, 122-131.
- Larkins, C., Aviles, G., East, M., Kahn, R. und Caspary, T.** (2011). Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4694-4703.
- Lee, J. und Gleeson, J.** (2010). The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiol. Dis.* **38**, 167-172.
- Lee, R., Zhao, Z. und Ingham, P.** (2016). Hedgehog signalling. *Development* **143**, 367-372.
- Leeuwenhoek, A.** (1677). Concerning little animals observed in rain-, well-, sea- and snow-water; as also in water wherein pepper had lain infused. *Pilos. Trans. Lond.* **12**, 821-831.
- Leggett, D., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R., Walz, T., Ploegh, H. und Finley, D.** (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol. Cell* **10**, 495-507.
- Levine, B. und Kroemer, G.** (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.
- Li, C., Jensen, V., Park, K., Kennedy, J., Garcia-Gonzalo, F., Romani, M., De Mori, R., Bruel, A., Gaillard, D., Doray, B., et al.** (2016). MKS5 and CEP290 Dependent Assembly Pathway of the Ciliary Transition Zone. *PLoS Biol.* **14**, e1002416.
- Lilienbaum, A.** (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **4**, 1-26.
- Lin, Y., Yan, M., Shih, Y. und Hsieh, C.** (2009). The basal body gene, RPGRIP1L, is a candidate tumour suppressor gene in human hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* **45**, 2041-2049.
- Liu, C. und Jacobson, A.** (2013). Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 103-110.
- Liu, H., Urbé, S. und Clague, M.** (2012). Selective protein degradation in cell signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 509-514.
- Liu, Y., Tsai, I., Morleo, M., Oh, E., Leitch, C., Massa, F., Lee, B., Parker, D., Finley, D., Zaghoul, N., et al.** (2014). Ciliopathy proteins regulate paracrine signaling by modulating proteasomal degradation of mediators. *J. Clin. Invest.* **124**, 2059-2070.

- Lo, R. und Massagué, J.** (1999). Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat. Cell Biol.* **1**, 472-478.
- Lorenzo, I., Liedtke, W., Sanderson, M. und Valverde, M.** (2008). TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12611-12616.
- Lucker, B., Behal, R., Qin, H., Siron, L., Taggart, W., Rosenbaum, J. und 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.
- Marley, A. und von Zastrow, M.** (2012). A simple cell-based assay reveals that diverse neuropsychiatric risk genes converge on primary cilia. *PLoS One* **7**, e46647.
- Martina, J., Chen, Y., Gucek, M. und Puertollano, R.** (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903-914.
- Massey, A., Kiffin, R. und Cuervo, A.** (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 2420-2434.
- Matei, D., Satpathy, M., Cao, L., Lai, Y., Nakshatri, H. und Donner, D.** (2007). The platelet-derived growth factor receptor alpha is destabilized by geldanamycins in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 445-453.
- McGill, M. und McGlade, C.** (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 23196-23203.
- Meyer, N. und Roelink, H.** (2003). The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* **257**, 343-355.
- Mijaljica, D., Prescott, M. und Devenish, R.** (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**, 673-682.
- Mijaljica, D., Prescott, M. und Devenish, R.** (2012). The intriguing life of autophagosomes. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3618-3635.
- Mitchison, H. und Valente, E.** (2017). Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J. Pathol.* **241**, 294-309.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. und Ohsumi, Y.** (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **27**, 107-132.
- Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A., et al.** (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J. Cell Sci.* **123**, 1785-1795.
- Mollet, G., Salomon, R., Gribouval, O., Silbermann, F., Bacq, D., Landthaler, G., Milford, D., Nayir, A., Rizzoni, G., Antignac, C., et al.** (2002). The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat. Genet.* **32**, 300-305.
- Muller, O.** (1786). *Animalcula infusoria; fluvia tilia et marina. Hauniae, Typis N. Mölleri.*
- Mullor, J., Sánchez, P. und Ruiz i Altaba, A.** (2002). Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol.* **12**, 562-569.
- Muñoz-Estrada, J., Lora-Castellanos, A., Meza, I., Alarcón Elizalde, S. und Benítez-King, G.** (2018). Primary cilia formation is diminished in schizophrenia and bipolar disorder: A possible marker for these psychiatric diseases. *Schizophr. Res.* **195**, 412-420.
- Nachury, M., Seeley, E. und Jin, H.** (2010). Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 59-87.

- Navé, B., Ouwens, M., Withers, D., Alessi, D. und Shepherd, P. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* **344**, 427-431.
- Nigg, E. und Raff, J. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* **139**, 663-678.
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Öberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M. und Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J. Biol. Chem.* **276**, 35847-35853.
- Ocbina, P., Tuson, M. und Anderson, K. (2009). Primary cilia are not required for normal canonical Wnt signaling in the mouse embryo. *PLoS One* **4**, e6839.
- Omran, H. (2010). NPHP proteins: gatekeepers of the ciliary compartment. *J. Cell Biol.* **190**, 715-717.
- Øverbye, A., Fengsrud, M. und Seglen, P. (2007). Proteomic analysis of membrane-associated proteins from rat liver autophagosomes. *Autophagy* **3**, 300-322.
- Pagán-Westphal, S. und Tabin, C. (1998). The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* **93**, 25-35.
- Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Díaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B., Satir, P. und Cuervo, A. (2013). Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* **502**, 194-200.
- Parzych, K. und Klionsky, D. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 460-473.
- Pazour, G., Agrin, N., Leszyk, J. und Witman, G. (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J. Cell Biol.* **170**, 103-113.
- Pazour, G., Dickert, B., Vucica, Y., Seeley, E., Rosenbaum, J., Witman, G. und 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. und Rosenbaum, J. (2002). Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.* **12**, 551-555.
- Pazour, G. und Witman, G. (2003). The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 105-110.
- Pedersen, L., Veland, I., Schrøder, J. und Christensen, S. (2008). Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn.* **237**, 1993-2006.
- Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R. und Rütther, 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.
- Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K. und Rütther, U. (2000). Organization of mouse Iroquois homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.* **10**, 1453-1462.
- Pickart, C. und Eddins, M. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1695**, 55-72.
- Plotnikova, O., Golemis, E. und Pugacheva, E. (2008). Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res.* **68**, 2058-2061.
- Plotnikova, O., Pugacheva, E. und Golemis, E. (2009). Primary cilia and the cell cycle. *Methods Cell Biol.* **94**, 137-160.

- Pratt, M., Titlow, J., Davis, I., Barker, A., Dawe, H., Raff, J. und Roque, H.** (2016). Drosophila sensory cilia lacking MKS proteins exhibit striking defects in development but only subtle defects in adults. *J. Cell Sci.* **129**, 3732-3743.
- Puri, C., Vicinanza, M. und Rubinsztein, D.** (2018). Phagophores evolve from recycling endosomes. *Autophagy* **14**, 1475-1477.
- Reiter, J., Blacque, O. und Leroux, M.** (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.* **13**, 608-618.
- Reiter, J. und Leroux, M.** (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 533-547.
- Rock, K., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. und Goldberg, A.** (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761-771.
- Roczniak-Ferguson, A., Petit, C., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T. und Ferguson, S.** (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci. Signal.* **5**, ra42.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L. und Scott, M.** (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**, 372-376.
- Rohatgi, R. und Snell, W.** (2010). The Ciliary Membrane. *Curr Opin Cell Biol.* **22**, 541-546.
- Rosenbaum, J. und Witman, G.** (2002). Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 813-825.
- Sang, L., Miller, J., Corbit, K., Giles, R., Brauer, M., Otto, E., Baye, L., Wen, X., Scales, S., Kwong, M., et al.** (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* **145**, 513-528.
- Sasai, N. und Briscoe, J.** (2012). Primary cilia and graded Sonic Hedgehog signaling. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 753-772.
- Satir, P., Pedersen, L. und Christensen, S.** (2010). The primary cilium at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 499-503.
- Saxton, R. und Sabatini, D.** (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976.
- Schilling, T., Concordet, J. und Ingham, P.** (1999). Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4. *Dev. Biol.* **210**, 277-287.
- Schneider, L., Clement, C., Teilmann, S., Pazour, G., Hoffmann, E., Satir, P. und Christensen, S.** (2005). PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr. Biol.* **15**, 1861-1866.
- Scholey, J.** (2008). Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.* **180**, 23-29.
- Schouteden, C., Serwas, D., Palfy, M. und Dammermann, A.** (2015). The ciliary transition zone functions in cell adhesion but is dispensable for axoneme assembly in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* **210**, 35-44.
- Schrader, E., Harstad, K., Holmgren, R. und Matouschek, A.** (2011). A three-part signal governs differential processing of Gli1 and Gli3 proteins by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **286**, 39051-39058.
- Schubert, U., Antón, L., Gibbs, J., Norbury, C., Yewdell, J. und Bannink, J.** (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-704.
- Selicorni, A., Colli, A., Passarini, A., Milani, D., Cereda, A., Cerutti, M., Maitz, S., Alloni, V., Salvini, L., Galli, M., et al.** (2009). Analysis of congenital heart defects in 87

- consecutive patients with Brachmann-de Lange syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* **149A**, 1268-1272.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M., et al.** (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* **31**, 1095-1108.
- Shah, A., Ben-Shahar, Y., Moninger, T., Kline, J. und Welsh, M.** (2009). Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* **325**, 1131-1134.
- Shi, X., Garcia, G. r., Van De Weghe, J., McGorty, R., Pazour, G., Doherty, D., Huang, B. und Reiter, J.** (2017). Super-resolution microscopy reveals that disruption of ciliary transition-zone architecture causes Joubert syndrome. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1178-1188.
- Shiina, A., Kanahara, N., Sasaki, T., Oda, Y., Hashimoto, T., Hasegawa, T., Yoshida, T., Iyo, M. und Hashimoto, K.** (2015). An Open Study of Sulforaphane-rich Broccoli Sprout Extract in Patients with Schizophrenia. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **13**, 62-67.
- Sillitoe, R. und Joyner, A.** (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **23**, 549-577.
- Singh, K., Connors, S., Macklin, E., Smith, K., Fahey, J., Talalay, P. und Zimmerman, A.** (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15550-15555.
- Singla, V. und Reiter, J.** (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**, 629-633.
- 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.
- Spassky, N. und Meunier, A.** (2017). The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 423-436.
- Stone, D., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T., Gu, Q., Johnson, R., Scott, M., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., et al.** (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* **384**, 119-120.
- Stratigopoulos, G., Burnett, L., Rausch, R., Gill, R., Penn, D., Skowronski, A., LeDuc, C., Lanzano, A., Zhang, P., Storm, D., et al.** (2016). Hypomorphism of Fto and Rpgrip1l causes obesity in mice. *J. Clin. Invest.* **126**, 1897-1910.
- Stratigopoulos, G., LeDuc, C., Cremona, M., Chung, W. und Leibel, R.** (2011). Cut-like homeobox 1 (CUX1) regulates expression of the fat mass and obesity-associated and retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein-1-like (RPGRIP1L) genes and coordinates leptin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **286**, 2155-2170.
- Stratigopoulos, G., Martin Carli, J., O'Day, D., Wang, L., Leduc, C., Lanzano, P., Chung, W., Rosenbaum, M., Egli, D., Doherty, D., et al.** (2014). Hypomorphism for RPGRIP1L, a ciliary gene vicinal to the FTO locus, causes increased adiposity in mice. *Cell Metab.* **19**, 767-779.
- Struchtrup, A., Wiegering, A., Stork, B., Rüther, U. und Gerhardt, C.** (2018). The ciliary protein RPGRIP1L governs autophagy independently of its proteasome-regulating function at the ciliary base in mouse embryonic fibroblasts. *Autophagy* **14**, 567-583.
- Tang, Z., Lin, M., Stowe, T., Chen, S., Zhu, M., Stearns, T., Franco, B. und Zhong, Q.** (2013). Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature* **502**, 254-257.

- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. und Kominami, E.** (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84-91.
- Tasouri, E. und Tucker, K.** (2011). Primary cilia and organogenesis: is Hedgehog the only sculptor? *Cell Tissue Res.* **345**, 21-40.
- Teilmann, S., Byskov, A., Pedersen, P., Wheatley, D., Pazour, G. und Christensen, S.** (2005). Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 444-452.
- Teilmann, S., Clement, C., Thorup, J., Byskov, A. und Christensen, S.** (2006). Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *J. Endocrinol.* **191**, 525-535.
- Tiwari, A., Lemke, J., Altmueller, J., Thiele, H., Glaus, E., Fleischhauer, J., Nürnberg, P., Neidhardt, J. und Berger, W.** (2016). Identification of Novel and Recurrent Disease-Causing Mutations in Retinal Dystrophies Using Whole Exome Sequencing (WES): Benefits and Limitations. *PLoS One* **11**, e0158692.
- Towers, C. und Thorburn, A.** (2016). Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine.* **14**, 15-23.
- Treier, M., Gleiberman, A., O'Connell, S., Szeto, D., McMahon, J., McMahon, A. und Rosenfeld, M.** (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* **12**, 1691-1704.
- Vadlamudi, R., Joung, I., Strominger, J. und Shin, J.** (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 20235-20237.
- van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M., Kyewski, B. und Rütger, U.** (1994). Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development* **120**, 2601-2607.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W., Yates, J. r., Koonin, E. und Deshaies, R.** (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-615.
- Vieillard, J., Paschaki, M., Duteyrat, J., Augière, C., Cortier, E., Lapart, J., Thomas, J. und Durand, B.** (2016). Transition zone assembly and its contribution to axoneme formation in Drosophila male germ cells. *J. Cell Biol.* **214**, 875-889.
- Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B. und Rütger, U.** (2007). Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* **134**, 2569-2577.
- Wang, B., Fallon, J. und Beachy, P.** (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423-434.
- Wang, S., Livingston, M., Su, Y. und Dong, Z.** (2015). Reciprocal regulation of cilia and autophagy via the MTOR and proteasome pathways. *Autophagy* **11**, 607-616.
- Ware, S., Aygun, M. und Hildebrandt, F.** (2011). Spectrum of clinical diseases caused by disorders of primary cilia. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **8**, 444-450.
- Watanabe, Y. und Nakamura, H.** (2000). Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development* **127**, 1131-1140.
- Waters, A. und Beales, P.** (2011). Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr. Nephrol.* **26**, 1039-1056.
- Wickliffe, K., Williamson, A., Jin, L. und Rape, M.** (2009). The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Chem. Rev.* **109**, 1537-1548.

- Wiegering, A., Dildrop, R., Kalfhues, L., Spsychala, A., Kuschel, S., Lier, J., Zobel, T., Dahmen, S., Leu, T., Struchtrup, A., et al. (2018a). Cell type-specific regulation of ciliary transition zone assembly in vertebrates. *EMBO J.* **37**, pii: e97791.
- Wiegering, A., Rütther, U. und Gerhardt, C. (2017). The role of Hedgehog signalling in the formation of the ventricular septum. *J. Dev. Biol.* **5**, 17.
- Wiegering, A., Rütther, U. und Gerhardt, C. (2018b). The ciliary protein Rpgrip11 in development and disease. *Dev. Biol.* , pii: S0012-1606(0018)30379-30378. [Epub ahead of print].
- Wigley, W., Fabunmi, R., Lee, M., Marino, C., Muallem, S., DeMartino, G. und 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., et al. (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.
- Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P. und Vandenabeele, P. (2012). Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* **22**, 43-61.
- Wolf, M., Saunier, S., O'Toole, J., Wanner, N., Groshong, T., Attanasio, M., Salomon, R., Stallmach, T., Sayer, J., Waldherr, R., et al. (2007). Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis. *Kidney Int.* **72**, 1520-1526.
- Won, J., Gifford, E., Smith, R., Yi, H., Ferreira, P., Hicks, W., Li, T., Naggert, J. und Nishina, P. (2009). RPGRIP1 is essential for normal rod photoreceptor outer segment elaboration and morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4329-4339.
- Xie, Z. und Klionsky, D. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102-1109.
- Yang, Z. und Klionsky, D. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 124-131.
- Yao, H., Whoriskey, W. und Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* **16**, 1433-1440.
- Yao, T. und Cohen, R. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**, 403-407.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. und Eskelinen, E. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**, 1180-1185.
- Yorimitsu, T. und Klionsky, D. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* **12**, 1542-1552.
- Zalli, D., Bayliss, R. und Fry, A. (2012). The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthisis, is both activated and degraded during ciliogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1155-1171.
- Zhang, X., Ramalho-Santos, M. und McMahon, A. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* **106**, 781-792.
- Zhao, C. und Malicki, J. (2011). Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos. *EMBO J.* **30**, 2532-2544.
- Zimmermann, K. (1898). Beitrag zur Kenntniss einiger Drüsen und Epithelien. *Arch. Mikrosk. Anat.* **52**, 552-706.

8 Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen:

Akt	Serin/Threonin-Kinase Akt (Akt serine/threonine kinase 1)
Atg	Autophagie-Protein (Autophagy-related protein)
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
Bbs	Bardet-Biedl-Syndrom-Protein
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Cep290	Zentrosomales Protein 290 (Centrosomal protein 290)
CIZE	Ziliäre Sperrzone (Ciliary Zone of Exclusion)
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie (Chaperone-Mediated Autophagy)
COACH	Joubert-Syndrom mit kongenitaler hepatischer Fibrose / Hypo/Aplasie des Kleinhirnwurms, Oligophrenie, kongenitale Ataxie, Kolobom, Leberfibrose (Cerebellar vermis aplasia, Oligophrenia, congenital Ataxia, Coloboma and Hepatic fibrosis)
CQ	Chloroquin <i>N'</i> -(7-chloroquinolin-4-yl)- <i>N,N</i> -diethyl-pentane-1,4-diamine
CRD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (Cone Rod Dystrophy)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dhh	Desert Hedgehog
E	Embryonaltag
EVC	Ellis van Creveld-Syndrom
Ft	Fused toes
Ftm	Fantom
Fto	Fatso; Fat mass and obesity associated
Fu	Fused
Gli	GLI-family zinc finger

Gli2-A	Gli2-Aktivator (Gli2-Activator)
Gli2-FL	Gli2-Volllänge (Gli2-Full Length)
Gli2-R	Gli2-Repressor (Gli2-Repressor)
Gli3-A	Gli3-Aktivator (Gli3-Activator)
Gli3-FL	Gli3-Volllänge (Gli3-Full Length)
Gli3-R	Gli3-Repressor (Gli3-Repressor)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen 293 (Human Embryonic Kidney cells 293)
Hh	Hedgehog
IFT	Intra-Flagellarer-Transport
IFT-A	IFT-Komplex A
IFT-B	IFT-Komplex B
Ihh	Indian Hedgehog
Invs	Inversin
IRD	Erbliche Netzhauterkrankungen (Inherited Retinal Dystrophy)
Irx	Iroquois Homeobox
JBTS	Joubert-Syndrom
Jbts	Joubert-Syndrom-Protein
Lc3	Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3
LCA	Lebersche Kongenitale Amaurose (Lebers Congenital Amaurosis)
Mad2	Mitotic Arrest Deficient 2
MEFs	Embryonale Maus-Fibroblasten (Mouse Embryonic Fibroblasts)
MKS	Meckel-Gruber-Syndrom
Mks	Meckel-Syndrom-Protein
mTor	Serine/Threonine Kinase mTor (mechanistic Target of Rapamycin serine/threonine kinase)
mTorc1	mTor Komplex 1 (mTor Complex 1)

NIH3T3	immortalisierte MEFs
Nek4	Never in Mitosis Gene A-related kinase 4
NPHP	Nephronophthise
Nphp	Nephrocystin
Nrf2	Nuclear factor, erythroid 2 like 2
OFD	Oro-fazio-digitales-Syndrom
Ofd	Oro-fazio-digitales-Syndrom-Protein
P	Postnataler Tag
p62 (Sqstm1)	Sequestosome 1
PCD	Primäre Ziliäre Dyskinesie (Primary Ciliary Dyskinesia)
Pdgrfa	Platelet-Derived Growth Factor Receptor α
PKD	Polyzystische Nierenerkrankung (Polycystic Kidney Disease)
Psmc	Proteasomale 26S Untereinheit, Non-ATPase
Ptc1	Patched 1
S.	Seite(n)
RP	Retinis Pigmentosa
Rpgr	Retinis Pigmentosa GTPase Regulator
Rpgrip1	Retinis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1
Rpgrip1l	Retinis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1 Like
Ser2448	Serin 2448
SFN	Sulforaphan
Shh	Sonic Hedgehog
SLS	Senior-Løken-Syndrom
Smo	Smoothened
Sufu	Suppressor of Fused
Tctn	Tectonic
Tgf β	Transforming Growth Factor β
Tmem	Transmembran-Protein

TZ	Transitionszone (Transition Zone)
UB	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VSD	Ventrikulärer Septumdefekt (Ventricular Septal Defect)

Einheiten:

kDa	Kilodalton
Mb	Megabasen
µm	Mikrometer
nm	Nanometer

9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütter für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese spannenden Projekte selbstständig zu bearbeiten. Ferner bedanke ich mich für seine Unterstützung und die stets hilfreichen Diskussionen.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Übernahme der Zweitkorrektur danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des EMTs für die schöne Zeit im Institut, die große Hilfsbereitschaft, die spaßigen Feiern und das angenehme Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt hierbei Christoph Gerhardt, der mich in den letzten Jahren durch eine großartige Betreuung unterstützt hat und mit dessen Hilfe auch die stressigeren Zeiten gemeistert werden konnten.

Widmen möchte ich diese Dissertation meiner Familie, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein größter Dank gilt somit meinen Eltern Hedwig und Ludwig, meiner Schwester Elisabeth und meinem Schwager Jens, auf deren Vertrauen und Rückhalt ich mich immer verlassen kann.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Analyse der Funktion des Transitionszonenproteins Rpgrip1l und der damit verbundenen molekularen Ursachen der Ausbildung von Ziliopathien“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Außerdem versichere ich, dass diese Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

Düsseldorf, den

(Antonia Wiegering)