

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Regulation der Hippo-Signalkaskade durch das Nephronophthise Protein Nima-Related Kinase 8 (NEK8/NPHP9)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Josef Gunther Sägmüller
aus Braunau am Inn [Österreich]

promoviert am 23. Mai 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln sowie das
Jahr der Erstellung (2025)

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. K. Lemberg

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen halten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente wurden nach entsprechender Anleitung durch Prof. Dr. Bernhard Schermer, Prof. Dr. Sandra Habbig sowie Dr. med. Malte Bartram von mir selbst ausgeführt und alle Daten wurden in meinem Laborbuch oder digital auf dem Nephro Lab Server gespeichert.

Die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden von mir mit Unterstützung von Frau Katrin Walter, der medizinisch-technischen Assistentin, durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Berlin, den 07.06.2024

Unterschrift:

Danksagung

Bevor ich in den Kern meiner wissenschaftlichen Arbeit eintauche, möchte ich an dieser Stelle einen Moment innehalten. Dieser Moment gilt der tiefen Dankbarkeit gegenüber all den Menschen, die mich auf dieser bedeutungsvollen Reise begleitet und gefördert haben.

Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. Bernhard Schermer für seine unermüdliche Hingabe und Leidenschaft zur Wissenschaft danken. Sein Einsatz hat nicht nur ein solides Fundament für diese Arbeit gelegt, sondern auch mich persönlich im Prozess zu einem besseren Mediziner geformt. Unter seiner Anleitung fand ich Inspiration und klare Orientierung, die mein weiteres Leben nachhaltig geprägt haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt Dr. Malte Bartram, dessen lehrreiche Anleitung in den handwerklichen Fertigkeiten der Laborarbeit für mich unverzichtbar war. Seine praxisnahe und geduldige Schulung war der Schlüssel zur erfolgreichen Umsetzung dieser Arbeit. Ohne seine Expertise und Hingabe hätte ich die komplexen Herausforderungen im Labor nicht meistern können.

Ebenso gebührt meine tiefste Dankbarkeit Prof. Dr. Sandra Habbig. Ihre fachkundige Beratung und unermüdliche Unterstützung waren fundamental für den Erfolg dieses Projekts. Sie war weit mehr als eine wertvolle Beraterin; ihre Weitsicht und Hingabe waren ein unersetzlicher Pfeiler dieser Arbeit.

Ein ausdrückliches Dankeschön geht an Katrin Walter und Stefanie Keller. Ihre Expertise und Hilfsbereitschaft in kniffligen Laborangelegenheiten waren für mich oft der rettende Anker und haben enorm zur Qualität meiner Arbeit beigetragen.

Abschließend möchte ich Lisa Müller und Daniel Jessen meinen tiefen Dank aussprechen. Ihr akribisches Lektorat und ihre präzisen Korrekturen meiner Dissertation waren von unschätzbarem Wert. Ihre ermutigenden Worte und konstruktiven Rückmeldungen gaben mir die Kraft und das Vertrauen, dieses anspruchsvolle Projekt erfolgreich abzuschließen.

Ein besonderes Maß an Dankbarkeit empfinde ich für meine Familie und vor allem für meine Eltern. Ihre beständige Unterstützung, ihr uneingeschränkter Glaube an mein Können und ihre bedingungslose Liebe haben mich gestärkt und mir die Energie gegeben, auch die größten Herausforderungen zu meistern. Ohne sie wäre diese Reise ungleich komplizierter gewesen und für ihre unermüdliche Unterstützung bin ich von Herzen dankbar.

Vielen Dank.

Meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	10
2.1. Nephronophthise	10
2.2. Polyzystische Nierenerkrankungen	12
2.3. Primäre Zilien und die ziliäre Hypothese der Ziliopathien	14
2.4. NPHP4 und NPHP9	16
2.5. Die Hippo-Signalkaskade	18
2.6. Fragestellungen der Arbeit	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Material	22
3.1.1. Material für die Zellkultur	22
3.1.2. Material für die Plasmidklonierung	22
3.1.3. Plasmide und <i>siRNA</i> Sequenzen	24
3.1.4. Material für Immunopräzipitation und Zellfraktionierung	25
3.1.5. Material für Western Blot	25
3.1.6. Primär- und Sekundärantikörper	26
3.1.7. Materialien für die Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.1.8. Sequenzierung	28
3.2. Methoden	29
3.2.1. Zellkultur	29
3.2.2. Plasmidklonierung	29
3.2.3. Transfektion mit Calciumphosphat	29
3.2.4. Transfektion von <i>siRNA</i> mittels Oligofectamin	30
3.2.5. Transfektion von Plasmiden mittels GeneJuice	30
3.2.6. Transformation von Bakterien	30
3.2.7. Lentiviraler Gentransfer	31
3.2.8. Immunopräzipitation (IP)	31
3.2.9. Zellfraktionierung	32

3.2.10. Proteinbiochemie mit Western Blot SDS-PAGE	33
3.2.11. Immunfloreszenzfärbung	35
3.2.12. Durchflusszytometrie	35
3.2.13. Polymerasekettenreaktion	36
3.2.14. Verdau mittels Restriktionsenzymen	37
3.2.15. Dephosphorylierung von Vektor DNA	37
3.2.16. Elektrophorese im Agarosegel	37
3.2.17. Aufreinigung von <i>DNA</i> -Fragmenten	38
3.2.18. Ligation von <i>DNA</i> -Fragmenten	38
3.2.19. Plasmidpräparation	38
3.2.20. Plasmidpräparation mit STET-Puffer	38
3.2.21. Sequenzierung	39
4. ERGEBNISSE	40
4.1. Interaktion der ziliären Proteine NPHP4 und NPHP9	40
4.2. Stabilisierung von nukleärem TAZ durch NPHP4 und NPHP9	41
4.3. Verlust von NPHP9 führt zu einer verminderten mitotischen Aktivität in TAZ transformierten Brustkrebszellen	44
5. DISKUSSION	47
5.1. Eine mögliche Rolle der Hippokaskade bei der NPH	47
5.2. Hippo bei der ADPKD und bei Tumorerkrankungen	51
6. LITERATURVERZEICHNIS	54
7. ANHANG	59
7.1. Abbildungsverzeichnis	59
7.2. Tabellenverzeichnis	59
8. VORABVERÖFFENTLICHEN VON ERGEBNISSEN	60

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADPKD	Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease
ANKS6	Ankyrin Repeat and Sterile Alpha Motif Domain Containing 6
APS	Ammoniumpersulfat
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
c-myc	cellular - myelocytomatose
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
G0	Gap 0
G1-Phase	Gap 1 Phase
G2	Gap 2
GPCR	G protein-coupled receptors
HEK	Human Embryonic Kidney
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HRP	Horseradish Peroxidase
ift88	Intraflagellar Transport 88
jck-Maus	juvenile cystic kidneys
JS	Joubert-Syndrom
Kibra	Kidney and Brain expressed Protein
Kif3a	Kinesin Family Member 3A
Kif3b	Kinesin Family Member 3B
LATS	Large Tumor Suppressor Kinase
LB	Luria-Bertani-Medium
mA	Milliampere
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MGS	Meckel-Gruber-Syndrom
MOB1	MOB kinase activator
M-Phase	Mitose Phase
MST	Mammalian Sterile 20-like Kinase
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
myr-AKT	myristoyliertes Protein Kinase B
NaVO ₄	Natriumvanadat
NDS	Normal Donkey Serum
NEK8	NIMA-Related Kinase 8
NPHP1	Nephrozystin-1
NPHP11	Nephrozystin-1
NPHP1L	Nephrozystin-1 Like
NPHP2	Nephrozystin-2
NPHP2L	Nephrozystin-2 Like
NPHP3	Nephrozystin-3
NPHP4	Nephrozystin-4
NPHP5	Nephrozystin-5
NPHP6	Nephrozystin-6
NPHP9	Nephrocystin-9
p130cas	p130 Crk-associated substrate

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Nephronophthise ist eine erbliche, zystische Nierenerkrankung und die häufigste genetische Ursache für terminales Nierenversagen bei Kindern und Jugendlichen. Ihre genetischen Ursachen sind komplex, und es sind Mutationen in über 20 Genen beschrieben, wobei Veränderungen in *NPHP1* am häufigsten sind. Bei 10% bis 20% der Patient:innen treten extrarenale Manifestationen auf, wobei Augen-, Zentralnervensystem-, Leber-, Knochen-, Herz- und Lungenbeteiligungen vorherrschend sind. Die betroffenen Gene kodieren Proteine, die Nephrozystine genannt werden, und in primären Zilien lokalisiert sind. Primäre Zilien sind sensorische Organellen, die in fast allen menschlichen Geweben und Zellen vorhanden sind und Signale aus der Zellumgebung ins Zellinnere übertragen. Die "ziliäre Hypothese" verknüpft den Verlust der renalen primären Zilien mit der Entstehung zystischer Nierenerkrankungen.

Der Hippo-Signalweg ist eine Signalkaskade, die die Zellproliferation und Apoptose reguliert und somit eine wichtige Rolle bei zystischen Nierenerkrankungen spielen könnte. In Säugetieren wird bei Aktivierung durch verschiedene Stimuli die zentrale Kinase MST aktiviert, die wiederum LATS aktiviert und die Effektorproteine TAZ und YAP phosphoryliert. Dadurch werden TAZ und YAP inaktiviert, indem sie nach ihrer Phosphorylierung an 14-3-3 gebunden und im Zytoplasma zurückgehalten oder abgebaut werden. Bei Inaktivität der Kaskade wird die Phosphorylierung unterbunden und TAZ und YAP translozieren in den Kern, was zu erhöhter Proliferation und reduzierter Apoptoserate führt. Das Nephronophthise-Protein NPHP4 wurde bereits als negativer Regulator des Hippo-Signalweges identifiziert und stellt die erste Verbindung zwischen der Hippo-Kaskade und Nephronophthise her. Ein ähnlicher Effekt wurde für NPHP9 vermutet. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass NPHP4 mit NPHP9 interagiert. Weitere Befunde ergaben, dass NPHP4 zu einer nukleären Anreicherung von NPHP9 führt. Nukleäres NPHP9 stabilisiert wiederum nukleäres TAZ und aktiviert eine TAZ-abhängige Transkription. TAZ wurde bereits als Onkogen in Brustkrebszellen identifiziert, mit einer deutlichen Korrelation zwischen Überexpression von TAZ und Invasivität dieser Zellen. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Zelllinien mit stabil exprimiertem TAZ eine höhere Proliferationsrate aufweisen und dass die TAZ-induzierte Hyperproliferation durch NPHP9-Suppression teilweise reversibel ist. Dieser antiproliferative Effekt durch NPHP9-Regulation wurde auch in endogen TAZ-dysregulierten MCF-7-Brustkrebszelllinien nachgewiesen. Die Ergebnisse legen nahe, dass NPHP9 ein attraktiver Angriffspunkt für zukünftige zielgerichtete antiproliferative Therapien sein könnte.

2. EINLEITUNG

2.1. Nephronophthise

Die Nephronophthise (NPH) stellt eine autosomal-rezessiv vererbte, chronisch verlaufende, zystische Nierenerkrankung dar, die durch eine eingeschränkte Fähigkeit der Nieren zur Konzentration des Urins sowie durch eine chronische tubulointerstitielle Nephritis gekennzeichnet ist und die häufigste genetische Ursache für ein terminales Nierenversagen im Kindes- und Jugendalter ist^{1,2}. Studien zufolge variiert die Inzidenz der NPH global und wird zwischen 1:50.000 und 1:900.000 angegeben^{3,4}. Es sollte berücksichtigt werden, dass diese Angaben möglicherweise eine Unterrepräsentation der tatsächlichen Inzidenzrate darstellen, da der weltweite Zugang zu molekularen Diagnostikverfahren limitiert ist^{3,4}.

Die NPH ist eine chronisch progrediente Erkrankung, die in der Regel vor dem Erreichen des 30. Lebensjahres zu einer terminalen Niereninsuffizienz führt⁵. Die klinische Einteilung der Erkrankung basiert auf verschiedenen Kriterien, darunter der Zeitpunkt des Eintritts der terminalen Niereninsuffizienz, die renale Ultraschalldiagnostik, die Histologie, extrarenale Manifestationen und die genetische Diagnostik. Sie wird in drei verschiedene Typen unterteilt, wobei das Alter bis zum Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz entscheidend ist: den infantilen Typ, der sich in der Regel im Kleinkindesalter manifestiert, den juvenilen Typ, der durchschnittlich im 13. Lebensjahr zur terminalen Niereninsuffizienz führt, und den adoleszenten Typ, der meist nach dem 19. Lebensjahr auftritt^{6,7,8}. Erwähnenswert ist, dass es vereinzelte Fallberichte von Patient:innen mit einer adulten NPH gibt, bei denen eine terminale Niereninsuffizienz erst im Alter zwischen 27 und 56 Jahren diagnostiziert wurde⁵.

Smith und Graham waren 1945 die Erstbeschreiber dieser Krankheit und sahen sie damals noch als eine sporadische Entität an. Dies änderte sich dann durch Fanconi im Jahr 1951, als Berichte von zwei großen Familien mit dieser Krankheit veröffentlicht wurden. Namensgebend für die Erkrankung waren ihre histopathologischen Charakteristika, denn der Begriff "Nephronophthise" leitet sich aus dem Griechischen ab. "Nephron" bedeutet Niere und "Phthise" Auszehrung oder Schwund⁹. Der Begriff beschreibt somit mikroskopisch und klinisch den Befund, der mit dieser Erkrankung einhergeht. Konkret zeigt sich eine Trias aus interstitieller Fibrose, Defekten der tubulären Basalmembran und Zystenbildung, vorwiegend an der kortikomedullären Grenze^{1,2}. Durch diese pathologischen Veränderungen kommt es zu einer Störung der physiologischen Filtrations- und Retentionsfähigkeit der Niere mit Anzeichen einer chronischen tubulointerstitiellen Nephritis^{1,2}.

Klinisch fallen initial eine Polyurie, Polydipsie mit dem Bedürfnis einer Flüssigkeitsaufnahme in der Nacht, sekundäre Enuresis, Anämie und Wachstumsretardierung auf. Im frühen Stadium der Erkrankung zeigt die Urinanalyse keine wegweisenden Befunde, insbesondere keine Proteinurie, Hämaturie oder Auffälligkeiten im Urinsediment⁵. Erst im späten Stadium der Erkrankung kann sich durch eine sekundäre Glomerulosklerose eine Proteinurie zeigen⁵.

Extrarenale Manifestationen, als Zeichen einer Multisystemerkrankung, treten bei etwa 10% bis 20% der betroffenen Individuen auf⁵. Dabei sind Augen-, Zentralnervensystem, Leber-, Knochen-, Herz- und Lungenbeteiligungen am häufigsten beschrieben⁵. Diese genetisch und phänotypisch überlappenden syndromalen Erkrankungen werden auch als NPH-verwandte Ziliopathien (*NPH-related ciliopathies* (NPH-RC)) bezeichnet¹⁰. Exemplarisch sollen hier einzelne dieser Syndrome kurz vorgestellt werden. Beim Senior-Loken-Syndrom (SLS) handelt es sich um eine okulo-renale Erkrankung, gekennzeichnet durch das gleichzeitige Auftreten einer NPH und einer Retinitis pigmentosa (schwere, chronisch progrediente Degeneration der Retina)¹¹. Schwerwiegende Störungen mit Fehlbildungen des zentralen Nervensystems, bilateraler zystischer Nierendysplasie, Gaumenspalte, Polydaktylie, Duktusproliferation im Portalbereich der Leber, Lungenhypoplasie und Situs inversus werden unter dem Meckel-Gruber-Syndrom (MGS) zusammengefasst¹². Kernmerkmal des Joubert-Syndroms (JS) ist eine Hypoplasie des Vermis cerebelli, optional verbunden mit Leber-, Augen- und Knochenbeteiligung¹³. Bei einer vorherrschenden Beteiligung des Knochensystems, gekennzeichnet durch Kraniosynostose, kurze Gliedmaßen, Brachydaktylie, schmalen Brustkorb und Gesichtsanomalien, wird von einem Sensenbrenner-Syndrom gesprochen¹⁴. Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine autosomal-rezessive Ziliopathie, die durch Netzhautdystrophie, Adipositas per magna, polydaktylyische Extremitäten, Nierenfunktionsstörungen, Lernschwierigkeiten und Hypogonadismus gekennzeichnet ist. Die Diagnose erfolgt hauptsächlich auf der Grundlage klinischer Befunde und der Genetik¹⁵.

Mittlerweile wurden mehr als 20 verschiedene Gene identifiziert, deren Mutation eine NPH verursacht⁵. Mutationen im *NPHP1*-Gen sind am häufigsten und repräsentieren etwa 20% bis 25% aller Fälle^{5,10,16}. Nephrozystin-1 (*NPHP1*), dass durch das Gen *NPHP1* kodiert wird, ist ein Adapterprotein, das sowohl in den primären Zilien als auch an der apikalen Oberfläche von Nierenepithelzellen lokalisiert ist. Dort interagiert es mit Molekülen, die an Zelladhäsion, Signalübertragung und Zellhomöostase beteiligt sind, wobei die Polyzystine am relevantesten sind¹⁷. *NPHP2*, *NPHP3*, *NPHP5*, *NPHP6* und *NPHP11* sind für etwa 2% bis 4% der Fälle verantwortlich, jedes der verbleibenden *NPHP*-Gene wahrscheinlich nur für 1% oder weniger und bei etwa zwei Dritteln der Fälle bleibt die genetische Ursache unbekannt (Stand 2018)¹⁰. Die Nephrozystine gehören zu einer vielfältigen Gruppe von Proteinen, die grundlegende

Unterschiede in Struktur und Funktion aufweisen¹⁸. Fast alle Nephrozystine befinden sich am primären Zilium¹⁸. Jedoch konnten Mutationen in *NPHP1L* und *NPHP2L* identifiziert werden, deren Proteinprodukte sich in Mitochondrien befinden¹⁹. Durch Lokalisationsanalysen konnten verschiedene Cluster identifiziert werden: der NPHP1-4-8-Cluster, der NPHP2-3-9-ANKS6-Cluster, der NPHP5-6-Cluster und der Meckel-Gruber-Cluster^{5,20,21,22}. Diese Komplexe arbeiten eng miteinander zusammen und sind wesentlich für die Ziliogenese sowie für eine regelhafte Funktion der Zilien verantwortlich. Daher führen Veränderungen in diesen Strukturen zu einem sehr breiten Spektrum an Phänotypen²³, was die Vielfalt der oben erwähnten genetischen Syndrome erklärt. Die Nephrozystine wurden mit unterschiedlichen Signalwegen in Verbindung gebracht, einschließlich der WNT-Kaskade, der Hedgehog-Kaskade, der DNA-Reparaturmechanismen (*DNA damage response*, DDR), der Hippo-Kaskade, des intrazellulären Calcium-Signalwegs, des cAMP-Signalwegs und der mTOR-Kaskade⁵. Zusammengefasst können die Vielfalt ziliärer Funktionen und das breite Vorkommen von Zilien im Körper das große Spektrum an Symptomen und Syndromen im Rahmen von Ziliopathien erklären¹⁰

2.2. Polyzystische Nierenerkrankungen

Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (*autosomal dominant polycystic kidney disease* ADPKD) stellt die häufigste monogenetische Ursache für terminale Niereninsuffizienz bei Erwachsenen dar, die mit einer Prävalenz von 1:1000 bis 1:2500 angegeben wird^{24,25,26}. Etwa 75% der betroffenen Individuen erreichen bis zum 70. Lebensjahr das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz und sind auf eine Nierenersatztherapie oder Organtransplantation angewiesen, wobei 5 bis 10% der Dialysepatient:innen an einer ADPKD leiden^{27,28,29}.

Ein Hauptmerkmal der ADPKD ist die zystische Transformation von Nierengewebe²⁶. Im Gegensatz zur Nephronophthise, bei der Patient:innen normalgroße oder verkleinerte Nieren mit Zysten aufweisen, die auf die kortikomedulläre Grenze beschränkt sind, entstehen bei der ADPKD hunderte von Zysten³⁰. Dies geht einher mit einer Hyperproliferation der tubulären Epithelzellen, einer massiven Vergrößerung der Nieren und einer Hypersekretion in den über das Parenchym verteilten Zysten³⁰.

Hypertonie ist bei der ADPKD sehr häufig und tritt bei den meisten Patient:innen mit vergrößerten Nieren oder verminderter glomerulärer Filtrationsrate auf²⁶. Weitere Komplikationen durch Zystenwachstum und -expansion umfassen akute und chronische Schmerzen, makroskopische Hämaturie, Zysteninfektionen und Nephrolithiasis, die Individuen in unterschiedlichem Maße beeinträchtigen können. Zusätzlich zu den direkten Manifestationen durch Kompression der benachbarten Organe und der verminderten

glomerulären Filtrationsrate können betroffene Individuen extrarenale Manifestationen aufweisen, einschließlich hepatischer und pankreatischer Zysten, intrakranieller Aneurysmen, abdomineller Hernien und kardialer Klappenvitien²⁶. Darüber hinaus können die üblichen Komplikationen einer abnehmenden glomerulären Filtrationsrate wie Anämie, sekundärer Hyperparathyreoidismus, metabolisch bedingte Osteoporose und erhöhtes kardiovaskuläres Risiko auftreten²⁶.

Ursächlich für diese Krankheit sind Mutationen in den Genen *polycystic kidney disease 1 (PKD1)* und *polycystic kidney disease 2 (PKD2)*³¹. In etwa 78% der Fälle von ADPKD konnten Mutationen im *PKD1*-Gen gefunden werden und in 15% der Fälle liegt eine Mutation im *PKD2*-Gen vor³¹. *PKD1*, lokalisiert auf Chromosom 16 (16p13.3), kodiert für Polyzystin-1 (PC1), ein großes multidomänen Glykoprotein, das an einer G-Protein-gekoppelten Stelle gespalten wird^{32,33}. *PKD2*, lokalisiert auf Chromosom 4 (4q21), kodiert für Polyzystin-2 (PC2), ein Protein, das zur Familie der transienten Rezeptorpotenzial-Kanäle gehört, die durch Calcium reguliert werden³⁴.

Die Genprodukte PC1 und PC2 bilden einen heterodimeren Komplex, der sich am primären Zilium befindet und wo sie Informationen aus der externen Umgebung an die Zelle übermitteln^{35,36}. Erwähnenswert ist, dass beide Polyzystine auch in anderen Zellkompartimenten zu finden sind, wie bei Zell-Zell-Kontakten und dem endoplasmatischen Retikulum^{35,36}. Der Aufbau von PC1 ist komplex und beinhaltet 11 transmembranöse Domänen, eine große extrazelluläre Domäne und einen ins Zytosol reichenden Fortsatz, wobei die Funktion noch schlecht verstanden ist^{35,36}. Es wird angenommen, dass PC1 und PC2 die Zystogenese in einer dosisabhängigen Weise inhibieren und dass die Zystogenese eintritt, wenn die Konzentration von PC1 oder PC2 unter einen bestimmten Schwellenwert fällt^{37,38}. Die Interaktion von PC1 und PC2 ist relevant für die Reifung von PC1, seinen Transport zu den primären Zilien und seine Stabilität^{39,40}. Der Funktionsverlust des primären Ziliums im Kontext der ADPKD führt zu einer Störung der Calciumhomöostase, gekoppelt mit einem Anstieg des cAMP-Spiegel, der hauptverantwortlich für die Zystenausdehnung ist³⁵. Es wurde aber auch die Rolle von Signaltransduktionskaskaden wie der mTOR, WNT- oder VEGF-Signalweg in Zusammenhang mit der Pathogenese der ADPKD beschrieben³⁵.

Die Konsequenzen einer Funktionsbeeinträchtigung im Kontext der ADPKD sind in den vergangenen Jahren eingehend mittels zellulärer Modelle und Versuchstieren untersucht worden. Auf dieser wissenschaftlichen Basis sind erste spezifische Behandlungsstrategien, im Sinne einer zielgerichteten Therapie, entwickelt worden, welche in klinischen Versuchsreihen aktuell evaluiert werden^{41,42}.

Bedeutende Forschungsarbeiten der jüngeren Vergangenheit haben aufgezeigt, dass Proteine, die für den NPH-Phänotyp oder für ADPKD verantwortlich sind, am primären Zilium lokalisiert sind. Aus diesem Grund soll im Folgenden diese spezielle Zellorganelle näher untersucht werden.

2.3. Primäre Zilien und die ziliäre Hypothese der Ziliopathien

Bei primären Zilien handelt es sich um nahezu auf allen menschlichen Zellen vorkommende⁴³, antennenähnliche, 1–10 µm lange und ca. 250 bis 300 nm im Durchmesser umfassende sensorische Organellen, die Signale aus der Zellumgebung aufnehmen und ins Innere der Zelle übertragen können^{44,45,46}.

Die Plasmamembran, die primäre Zilien umhüllt, zeigt eine spezifische Zusammensetzung von Lipiden und Proteinen, die sich von der übrigen Zellmembran abhebt⁴⁷. Zudem ist die Oberfläche der primären Zilien rund 500-fach kleiner als die gesamte Plasmamembran der Zelle, während ihr Volumen sogar etwa 5.000-fach geringer ist als das des Zytosplasmas⁴⁸. Ihre einzigartigen strukturellen Eigenschaften qualifizieren primäre Zilien als effektive Schnittstellen für zelluläre Kommunikation⁴⁸. Sie ermöglichen die rasche Umwandlung von extrazellulären Signalen in intrazelluläre Reaktionswege, was zur Induktion adäquater physiologischer Zellantworten führt⁴⁸. Aufgrund dieser spezialisierten Funktion sind in der Membran der Zilien zahlreiche zielgerichtete Rezeptoren lokalisiert, die in der Lage sind, eine Vielzahl von physikalischen, mechanischen und chemischen Stimuli zu detektieren⁴³.

Primäre Zilien sind aus einem Axonem aufgebaut, das auf einer speziellen Mikrotubulistruktur basiert und aus einem sogenannten Basalkörper entsteht. Dieser Basalkörper fungiert auch als Mikrotubuli-Organisationszentrum und dient der Verankerung des Ziliums^{43,23}. Zilien können anhand der An- oder Abwesenheit eines zentralen Mikrotubuli-Doppelpaars als 9+2 oder 9+0 kategorisiert werden^{47,23}. Während beide Typen zu etwa 75% aus den gleichen strukturellen Elementen bestehen, sind es vor allem die 9+0-Zilien, die sich durch die Abwesenheit eines zentralen Mikrotubuli-Paars auszeichnen, die im menschlichen Körper weit verbreitet sind^{49,23}.

Die Grenze zwischen den ziliären und anderen Zellkompartimenten wird u.a. durch die Transitionszone markiert, in der der Import und Export von ziliären Proteinen reguliert wird⁴³. Lokalisiert am distalen Ende des Basalkörpers und definiert durch die Anwesenheit von Y-Verbindern und Übergangfasern, stellt die Transitionszone eine Diffusionsbarriere dar, die den Ein- und Austritt von Proteinen in das Zilium kontrolliert^{50,51}. Das Inversin-Kompartiment, das distal zur Transitionszone liegt, ist ein eigenständiger Unterbereich des primären Ziliums. Es ist charakterisiert durch die Lokalisierung des Inversin-Proteins, welches durch *NPHP2*

kodiert wird, einem prominenten Vertreter, der mit einer NPH assoziiert ist^{52,53}. Daher wird die proximale Region des Ziliums als wichtiger Regulator der Ziliogenese verstanden.

Motorproteine bewegen Proteinkomplexe entlang des ziliären Axonems in einem Prozess, der als intraflagellärer Transport bezeichnet wird⁵⁴. Der antegrade Transport zur Spitze des Ziliums wird durch Kinesin-2 und dessen Untereinheiten Kif3a und Kif3b angetrieben^{55,56}, während der retrograde Transport durch das zytoplasmatische Dynein-2 vermittelt wird⁵⁷. Der intraflagelläre Transport ist für die regelhafte Funktion des primären Ziliums unabdingbar, da im primären Zilium keine Proteinbiosynthese stattfindet⁵⁴. Mutationsanalysen bei Mäusen mit zystischen Nierenerkrankungen konnten erstmals eine Verbindung zwischen der Pathogenese zystischer Nierenerkrankungen im Säuger und dem Zilium durch das für den intraflagellären Transport entscheidende Gen *ift88/polaris* herstellen^{58,59}. Diese Mäuse wiesen renale Zysten, Wachstumsretardierung sowie die Ausbildung eines Hydrocephalus auf^{58,59}.

Bei primären Zilien handelt es sich um dynamische Organellen, die in Koordination mit dem Zellzyklus und embryonalen Signalen auf- und abgebaut werden können^{60,61}. Die Bildung von Zilien, auch als Ziliogenese bezeichnet, findet in ruhenden Zellen statt und wird in proliferierenden Zellen unterdrückt⁶². Bemerkenswert ist, dass primäre Zilien zu Beginn der G1-Phase aufgebaut und dann vor der Zellteilung vollständig wieder abgebaut werden⁶³. Nach der Zellteilung werden ein Paar von Mutter- und Tochter-Zentriolen aus ihrer Position innerhalb des mitotischen Spindelapparats freigesetzt und migrieren zu einer subplasmamembranären Stelle, wo sie reifen, um den Basalkörper zu bilden⁴⁹. Somit ist der Abbau des primären Ziliums für die Zellteilung unentbehrlich und wird u.a. durch HDAC6 und die Kinasen Aurora A und Plk1 reguliert^{64,65}.

Durch eine Gruppe spezifisch lokalisierter, zilienassozierter Rezeptoren, einschließlich Wingless/Integrated (WNT), Hedgehog, Transforming Growth Factor β (TGF β) und Thrombozyten-abgeleiteten Wachstumsfaktor-Rezeptoren (PDGFRs), erfassen Zilien extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Hormone und andere Stimuli²³. Diese werden in Signalwege umgewandelt, die lokal angereicherte Effektorprotein aktivieren. Diese lösen wiederum nachgeschaltete Effekte aus, die die Gewebedifferenzierung und -homöostase, Zellproliferation und -wachstum sowie Organentwicklung und -funktion steuern^{44,66,23}. Zilien wurden ebenfalls in der Regulation der planaren Zellpolarität in Verbindung gebracht. Der Signalweg steuert die orientierte Zellteilung, die für die Entwicklung der Nierentubuli entscheidend ist. Störungen dieses Prozesses werden häufig bei zystischen Nierenerkrankungen beobachtet²³.

Aufgrund der Tatsache, dass der Verlust der renalen primären Zilien zur Entstehung von zystischen Nierenerkrankungen führt und dass die meisten Krankheitsgene von hereditären

zystischen Nierenerkrankungen ziliäre Proteine kodieren, wurde die "ziliäre Hypothese" formuliert. Diese postuliert eine bedeutende Rolle von Zilien in der molekularen Pathogenese von Zystennieren⁶⁷. Diese Dissertation richtet ihr Augenmerk besonders auf Nephrozystin-4 und Nephrozystin-9, zwei Proteine, die mit dem Hippo Signalweg in Verbindung gebracht wurden.

2.4. NPHP4 und NPHP9

Bei Nephrozystin-4 (NPHP4) handelt es sich um ein aus 1.426 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen Gen auf Chromosom 1p36.31 lokalisiert ist⁶⁸. Es wurde erstmals bei NPH-Patient:innen identifiziert, bei denen keine Mutationen in den *NPHP1*-, 2- oder 3-Genen gefunden wurden⁶⁹. Das NPHP4 Protein befindet sich in der Transitionszone am Basalkörper und dem kortikalen Aktinzytoskelett in polarisierten Zellen⁶⁸. Ähnlich wie Inversin befindet es sich auch in teilenden Zellen an den Zentrosomen⁷⁰. Untersuchungen haben gezeigt, dass NPHP4 mit zellulären Adhäsionsstrukturen wie p130cas, Filamin und Tensin interagiert⁶⁸, wie mit anderen NPH-Proteinen und den NPHP1-4-8-Komplex bildet²¹.

NPHP4 reguliert dabei in humanen retinalen Epithelzellen die Lokalisation von NPHP1⁷¹. Mutationen von NPHP4 in *C. elegans* führen bei einem gestörten intraflagellaren Transport zu erheblichen Strukturdefekten⁷². NPHP4 wurde in Zusammenhang mit der Ubiquitin-Ligase JADE1 und dem kanonischen WNT-Signalweg, einer wichtigen Kaskade für embryonale Differenzierung, gebracht⁷³. Patient:innen mit *NPHP4*-Mutationen zeigen oft eine juvenile NPH mit oder ohne Retinitis pigmentosa⁷⁰. In einer türkischen Studie wurde die Häufigkeit von homozygoten oder zusammengesetzten heterozygoten *NPHP4*-Mutationen mit niedrigen 2,4% unter 250 Patient:innen mit Nephronophthise festgestellt⁷⁰.

Das Gen *NPHP9* kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase Nephrozystin-9 oder NEK8 (*NIMA-Related Kinase 8*), die aus 692 Aminosäuren besteht und auf Chromosom 17q11.1 lokalisiert ist^{5,74,75}. Das Genprodukt NPHP9/NEK8 spielt eine Schlüsselrolle im Inversin-Kompartiment des Ziliums, wo es mit anderen NPH-Proteinen interagiert⁷⁶. Darüber hinaus wurde auch eine nukleäre Lokalisierung dieses Proteins nachgewiesen⁷⁷. Es konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von NEK8 an Zentrosomen und Zilien durch die Kinaseaktivität sowie durch die C-terminale nicht-katalytische RCC1-Domäne reguliert wird⁷⁷. Eine Studie identifiziert *Ankyrin Repeat and Sterile Alpha Motif Domain-Containing Protein 6* (ANKS6) als Ziel und Aktivator der ziliären Kinase NEK8 und zeigt durch die Analyse zweier neuer Mausmutationen, dass die Aktivierung von NEK8 im ziliären Inversin-Kompartiment entscheidend für die korrekte Ausrichtung von Links-rechts, die Entwicklung des Herz-Lungen-Systems und die Nierenmorphogenese ist⁷⁸.

Eine Punktmutation in Nek8 wurde erstmals als ätiologische Ursache für polyzystische Nierenerkrankungen im juvenilen zystischen Nieren-Mausmodell (*juvenile cystic kidneys, jck-Maus*) identifiziert und im Zebrafischmodell bestätigt⁷⁹. In den betroffenen Tieren wurde eine veränderte Lokalisierung von Nphp9/Nek8 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Eine nahezu unmittelbare postnatale Letalität tritt auf, wenn Nphp9/Nek8 vollständig fehlt. Zudem weisen diese Tiere eine gestörte Links-Rechts-Asymmetrie, kardiale Defekte und glomeruläre Nierenzysten auf⁷⁹. Bei jck/Nek8-Komplexheterozygoten entwickelten die betroffenen Tiere eine weniger ausgeprägte zystische Erkrankung als jck-Homozygote, was darauf hindeutet, dass das jck-Allel möglicherweise ein *Gain-of-Function* Protein kodiert. NEK8 und Polyzystin-2 (PC2) interagieren miteinander, und die embryonalen Phänotypen von Nek8(-/-) und Pkd2(-/-) sind auffallend ähnlich⁸⁰. Nek8-defiziente Embryonen und Zellen exprimierten pc2 regulär und das Protein lokalisierte ordnungsgemäß an den Zilien. Ähnlich wie bei Zellen, denen pc2 fehlt, zeigten Nek8-depletierte Sammelrohrzellen der inneren Medulla eine defekte Reaktion auf Flüssigkeitsscherung. Dies legt nahe, dass Nek8 möglicherweise eine Rolle bei der Vermittlung von pc2-abhängiger Signalübertragung spielt⁸⁰. Proteomik-Studien an Nierenzysten von jck-Mäusen zeigten eine Regulation von Nek8 auf Vimentin, Sorcin und Galectin-1, was auf eine Rolle von Nek8 in der Zellzykluskontrolle hindeutet⁸¹.

NEK8 ist außerdem ein Tumor-assoziiertes Gen, das eine Überexpression in menschlichen primären Brusstumoren aufweist. Darüber hinaus ist es potenziell in der G2/M-Phase des Zellzyklus involviert und moduliert die Konzentrationen von Aktinprotein sowie Cyclin-dependent kinase 1/cyclinB1. Diese Befunde legen nahe, dass NEK8 eine komplexe Rolle sowohl in der Tumorentwicklung als auch in der Regulation des Zellzyklus spielt⁸². In Kolorektalen Karzinomen ist NEK8 signifikant hochreguliert und fördert die Proliferation der Krebszellen. Dabei könnte NEK8 die Expression des Proteins c-myc posttranslational durch Phosphorylierung an den Serin 405-Stellen beeinflussen. Zusätzlich wurde eine positive Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von NEK8 und c-myc in kolorektalen Gewebeproben festgestellt⁸³.

In einer aktuellen Studie von 2023 wurde NEK8 als ein weiteres Krankheitsgen für die ADPKD vorgeschlagen. Die Studie untersuchte 12 Familien und kombinierte klinische Bewertungen mit funktionellen Studien an betroffenen Zellen⁸⁴. Interessanterweise weisen spezifische heterozygote Missense-Varianten in der Kinase-Domäne von NEK8 einen dominant-negativen Effekt auf. Diese Varianten beeinträchtigen die Kinase-Aktivität und die Signalübertragung von DNA-Schäden, was zu einer veränderten Polyzystin-2 Lokalisierung in den Zilien führt. Diese Erkenntnisse stellen NEK8 als eine neue genetische Ursache für ADPKD vor und erweitern unser Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Erkrankung⁸⁴.

2.5. Die Hippo-Signalkaskade

Wachstum, Differenzierung und Reparatur von Geweben und Organen werden durch komplexe biologische Prozesse koordiniert, die durch verschiedene Signalkaskaden miteinander verbunden sind. Der Hippo-Signalweg konnte als ein solcher Regulator von Organgröße, Proliferation und Apoptose identifiziert werden⁸⁵. Ursprünglich wurde der Signalweg im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* das erste Mal beschrieben⁸⁵. In den ersten wegweisenden Studien wurden mutmaßliche Tumorsuppressorgene beschrieben, die an der Proliferation und dem Wachstum in verschiedenen epithelialen Geweben beteiligt sind⁸⁵.

Die Kernkinasen wurden ursprünglich in der Fruchtfliege identifiziert und später wurden ihre entsprechenden menschlichen Orthologe gefunden³⁰. Die Warts-Kinase (Ortholog: *Large Tumor Suppressor Kinase*, LATS1/2) wurde im Jahr 1995 entdeckt^{85,86}, gefolgt vom Koaktivator Salvador (Ortholog: *Salvador Family WW Domain Containing Protein 1*, SAV1) im Jahr 2002^{87,30}. Schließlich wurde 2003 die Hippo-Kinase (Ortholog: *Mammalian Ste20-like Kinases*, MST1/2) gefunden^{88,89,30}. Der Name dieser Signalkaskade leitet sich von der Beobachtung ab, dass die Blockierung der Hippo-Expression in den Scheibenzellen des Auges der Fruchtfliege zu vergrößerten, gefalteten Augen führt, die eine namensgebende Ähnlichkeit mit einem Nilpferd (*Hippopotamus amphibius*) aufweisen³⁰. Das Zielprotein Yorkie, dessen menschliche Orthologe Yes-associated Protein (YAP) und *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ) sind, wurde im Protein Interaktions-Screening entdeckt^{90,30}. Nach der Identifizierung der verschiedenen Effektorproteine konnten zuvor eher unzusammenhängende Proteine zu einer klassischen Signalkaskade zusammengesetzt werden³⁰. Die zentralen Elemente sind Hippo und sein Koaktivator Salvador stromaufwärts, Warts und sein Koaktivator Mats (Ortholog: *MOB Kinase Activator 1A/B* MOB1) im Zentrum und Yorkie als nachgeschalteter Effektor. Bei aktiverter Hippo-Signalgebung wird Yorkie phosphoryliert und bindet an das zytoplasmatische 14-3-3-Protein, wodurch es im Zytosol zurückgehalten oder abgebaut wird³⁰. Bei inaktiviertem Hippo wird Yorkie nicht im Zytosol zurückgehalten und kann in den Kern eindringen, um proliferative und antiapoptotische Transkripte zu aktivieren³⁰.

Der Hippo-Signalweg erweist sich bei Säugetieren als komplexer, was sich darin zeigt, dass jede der drei Kernkomponenten des Pfades in doppelter Ausführung vorhanden ist⁹¹: Es existieren zwei Säugetier MST Kinasen, zwei LATS Kinasen, und zwei Orthologe des Proteins Yorkie, YAP/TAZ. Das grundlegende Prinzip bleibt dennoch ähnlich³⁰. Wie beim Hippo-Signalweg in der Fruchtfliege führt eine Aktivierung der MST1/2 oder LATS1/2 Kinasen zu einer zytosolischen Arretierung der Effektorproteine TAZ/YAP³⁰. Ist der Hippo-Signalweg jedoch ausgeschaltet, kommt es zu einer nukleären Translokation dieser Proteine und

überwiegend zur Aktivierung von TEAD abhängigen Transkriptionsfaktoren und Zielgenen³⁰. MST, die übergeordnete Kinase, kann auf verschiedene Weisen aktiviert werden, beispielsweise durch Autophosphorylierung oder Phosphorylierung durch TAO-Kinasen. Aktives MST phosphoryliert SAV1 und MOB1, was wiederum zur Phosphorylierung von LATS und zur Aktivierung der Signalkaskade führt. Auf die Hippo-Kaskade können auch verschiedene andere Komplexe einwirken³⁰. Es wurde nachgewiesen, dass die apikalen Par/Kibra/NF2 und lateralen Scribble Polaritätskomplexe eine Translokation von LATS an die Zellmembran bewirken und so die Hippo-Kaskade modulieren können³⁰. Andere Signalwege, wie WNT, GPCR, Notch oder TGFβ, können ebenfalls die zentralen Effektorproteine TAZ/YAP beeinflussen^{92,30}. Mechanische Signale, wie eine hohe Steifigkeit der extrazellulären Matrix, mechanischer Stress und eine hohe Aktomyosin-Kontraktilität begünstigen die Aktivierung von YAP/TAZ^{93,30}.

Eine Fehlregulation des Hippo-Signalwegs ist in vielen menschlichen Tumoren häufig über eine fehlerhafte YAP/TAZ Regulation zu beobachten. Kürzlich zeigte eine systematische Profilerstellung von 9.125 Tumorproben eine weit verbreitete Dysregulation der Komponenten des Hippo-Signalwegs in verschiedenen menschlichen Krebsarten, einschließlich Gliomen, Kolorektalen Karzinomen und Zervixkarzinomen⁹⁴. Unkontrollierte Zellproliferation ist ein grundlegender Aspekt von Neoplasien. Die Rolle der YAP/TAZ-Dysfunktion bei malignen Transformationen ist mittlerweile gut belegt^{95,94}. Eine Überexpression oder Hyperaktivierung von YAP führt in verschiedenen Zelltypen *in vitro* zu einer starken Zellproliferation. Ähnlich führt die Aktivierung von YAP bei Mäusen ebenfalls zu einer übermäßigen Proliferation in mehreren Geweben^{96,94}. Des Weiteren wurde eine Fehlregulation von YAP in verschiedenen Tumoren, einschließlich Medulloblastomen, Glioblastomen, Bronchialkarzinomen und Pankreastumoren, dokumentiert⁹⁷. Speziell in Medulloblastomen wurde eine Genamplifikation von YAP beobachtet, die mit einem signifikant erhöhten Expressionsniveau von YAP und einer verstärkten nukleären Lokalisation korreliert^{97,98}. Zudem kann eine Überexpression von YAP eine maligne Transformation von Ovarialzellen induzieren^{99,100}. Die zentralen Kinasen des Tumorsuppressorkomplexes, MST1/2 und LATS1/2, sind ebenfalls mit einer Vielzahl von Tumoren assoziiert¹⁰¹. Beispielsweise sind Mutationen in MST1/2 mit Krankheitsbildern wie akuter myeloischer Leukämie gefunden worden¹⁰², und Mutationen in LATS1/2 mit Mammakarzinomen¹⁰³ sowie Sarkomen¹⁰⁴ vergesellschaftet.

Jenseits ihrer Beteiligung an der Krebsentwicklung scheinen die Gene *TAZ* und *YAP* erhebliche Auswirkungen auf die Nierenentwicklung zu besitzen. Studien haben demonstriert, dass die Inaktivierung von *TAZ* in Mäusen zur Entstehung von Nierenzysten beiträgt¹⁰⁵. Mäuse, in denen *TAZ* ausgeschaltet wurde, präsentierten bereits in embryonalen Stadien Nierenzystenbildung, eine Dilatation der Bowman-Kapsel und des proximalen Tubulus¹⁰⁵. Im

Gegensatz dazu resultierte eine spezifische Inaktivierung von *YAP* in Mäusen nicht zu Nierenzysten, sondern zu dysplastischen Nieren mit sporadischen Tubuli¹⁰⁶. Ein kombinierter Verlust von *TAZ* und *YAP* führte zu einem Mischphänotypen mit sowohl dysplastischen Nieren als auch stark dilatierten zystischen Tubuli¹⁰⁶. Daraus kann abgeleitet werden, dass *YAP* und *TAZ* in der Nierenentwicklung unterschiedliche Rollen einnehmen¹⁰⁶.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass der Hippo-Signalweg eine zentrale Rolle in der Regulierung von Wachstum und Zellproliferation spielt, insbesondere durch die Kontrolle von *YAP/TAZ*. Eine präzise Balance dieser Aktivität ist von wesentlicher Bedeutung für die Gewebeintegrität und Funktionalität. Übermäßige Aktivität von *YAP/TAZ* kann zur Hyperproliferation und malignen Transformation führen. Im Gegensatz dazu kann eine suboptimale Aktivität von *YAP/TAZ* eine Degeneration der Gewebestruktur und Beeinträchtigung der Geweberegeneration nach sich ziehen³⁰.

2.6. Fragestellungen der Arbeit

Die Nephronophthrose ist charakterisiert als eine autosomal-rezessiv vererbte, zystisch-fibrotische Nierenerkrankung. Zusätzlich zu den renalen Symptomen weisen 10% bis 20 % der betroffenen Individuen extrarenale Manifestationen auf. Die Ursache der Erkrankung sind Mutationen in den *NPHP*-Genen. Beachtenswert ist, dass die Mehrheit der krankheitsrelevanten Proteine im primären Zilium lokalisiert ist. In Anbetracht der fundamentalen Funktion von Zilien im Zellzyklus und der Signaltransduktion ist anzunehmen, dass Dysfunktionen dieser Strukturen mit Störungen im Zellwachstum und in der Regeneration assoziiert sind. Der evolutionär hoch konservierte Hippo-Signalweg, ein zentraler Regulator der Zellproliferation und Organgröße, wurde kürzlich mit ziliären Proteinen in Verbindung gebracht.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen die NPH-Proteine NPHP4 und NPHP9, die eine Funktion bei der Regulation des Hippo-Signalwegs übernehmen. Angesichts der Architektur des Hippo-Signalwegs als klassische Signalkaskade ist es ein weiteres Anliegen, potenzielle hierarchische Beziehungen zwischen den involvierten Akteuren zu erforschen. Speziell wird der Frage nachgegangen, wie die Translokation von Hippo-Effektorproteinen in den Zellkern durch NPHP4 und NPHP9 beeinflusst wird. Vor dem Hintergrund, dass der Hippo-Signalweg bereits mit malignen Tumoren in Verbindung gebracht wurde, soll darüber hinaus das Potenzial von Nephrozystinen im Kontext von Zellwachstum und Proliferation untersucht werden. Diese Erkenntnisse könnten fundamentale Implikationen für die Entwicklung neuer Therapieansätze bei Krebserkrankungen haben, die durch eine Dysregulation des Hippo-Signalwegs charakterisiert sind.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Material für die Zellkultur

Zelllinie	Beschreibung & Kultivierung	Referenz
HEK 293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen Kultivierung bei 37°C und 5% CO ₂	Prof. Dr. B. Seed (Harvard Medical School, Boston)
MCF10A	Humane, nicht transformierte Brustdrüsenzellen Kultivierung bei 37°C und 5% CO ₂	MCF 10A ATCC CRL-10317
F.TAZ MCF10A	F.TAZ exprimierende MCF10A Zellen, Kultivierung bei 37°C und 5% CO ₂	Lentiviraler Gentransfer Ausgangszelllinie: MCF 10A (ATCC CRL-10317)

Tabelle 1 Eukaryote Zellen

Zellkulturmedium	Rezeptur
HEK293T Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) 10% Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i> ; FBS)
MCF7	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) 10% Kälberserum
MCF10A	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM/F12) 5% Pferdeserum 0,5 mg/ml Hydrocortison 100 ng/ml Cholera Toxin 20 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal growth factor</i>) 10 mg/ml Insulin

Tabelle 2 Kulturmedien für eukaryote Zellen

3.1.2. Material für die Plasmidklonierung

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
DH10 B T1	FendA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ lacX74 Φ 80lacZ Δ M15 araD139 Δ (ara,leu)7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) λ	Invitrogen

Tabelle 3 Prokaryote Zellen

Kulturmedien für Prokaryoten	Rezeptur
LB-Trockensubstanz	5 g Hefeextrakt 10 g Caseinpepton 10 g Natriumchlorid
Luria-Bertani-Medium (LB)	20 g LB Trockensubstanz in 1 L Reinstwasser 100 µg/ml Ampicillin
Luria-Bertani-Agar	20 g LB Trockensubstanz in 1 L Reinstwasser 100 µg/ml Ampicillin 20 g Agar Agar
SOC-Medium	2% (w/v) BactonTM-Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 10 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid ph-Wert Korrektur auf 7,0 und im Anschluss autoklavieren 10 nM Magnesiumchlorid 20 mM Glukose (unter aseptischen Bedingungen hinzugeben) Lagerung bei -20°C

Tabelle 4 Kulturmedien für prokaryote Zellen

Bestandteil	Restriktionsenzymanalyse für PCR-Produkte	Restriktionsenzymanalyse zur Plasmidanalyse
DNA	26 µl aufgereinigtes PCR-Produkt	1 µl
Restriktionsenzym	je 0,5 µl (2,5 U)	je 0,5 µl (2,5 µl)
10fach Puffer	3 µl	1,5 µl
doppelt destilliertes Wasser	ad 30 µl	ad 15 µl

Tabelle 5 Ansatz für Restriktionsenzym-Analyse

Bestandteil	Ligationsansatz	Kontrollansatz
doppelt destilliertes Wasser	11 µl	15 µl
T4-Ligase	2,5 U	2,5 U
10x Ligationspuffer	2 µl	2 µl
Insert	4 µl	-
Vektor	2 µl	2 µl

Tabelle 6 Ansatz für die DNA-Ligation

3.1.3. Plasmide und siRNA Sequenzen

Konstruktnname	Vektor	Insertionsgen	Referenz
F.GFP & V5.GFP	pcDNA6	eGFP	Nephro Lab
F.hNPHP4 & V5.hNPHP4	pcDNA6	hNPHP4 fl	Nephro Lab
F.hNPHP9 & V5.hNPHP9	pcDNA6	hNPHP9	Nephro Lab
F.Eps & V5.Eps	pcDNA6	Eps 1-225	Nephro Lab
F.mTAZ & V5.mTAZ	pcDNA6	mTAZ fl	Nephro Lab

Tabelle 7 Plasmidkonstrukte

Gen	siRNA	Sequenz	Hersteller
hNPHP9	siNPHP9 #1	ACGGACAGTTGGCACCAATA	Qiagen
hNPHP9	siNPHP9 #2	CCAGAAGCTGGTGATCATCAA	Qiagen
hTAZ	siTAZ	AGGTACTCCTCAATCACA	Biomers
Kontrolle	siKontrolle (scrambeld)	AAATGTACTGCGCGTGGAGAC	Biomers

Tabelle 8 siRNA Sequenzen

Plasmid		Referenz
pcDNA6	pcDNA6	Invitrogen
pENTR1a	pENTR1a	Invitrogen
pLenti6/V5	pLenti6/V5	Invitrogen
F.mTAZ pENTR1a	F.mTAZ pENTR1a	Invitrogen
F.mTAZ pLenti6/V5	pLenti6/V5	Invitrogen
pMDL g/p	pMD	HIV-1 GAG/POL
pMDS2 vsv	pMD2.G	VSV G
pRSV rev	pRSV-Rev	Rev

Tabelle 9 Plasmide für lentiviralen Gentransfer

3.1.4. Material für Immunopräzipitation und Zellfraktionierung

Pufferlösungen	Rezeptur
IP-Puffer (Stammlösung)	1% Triton X-100 50 nM Natriumchlorid 50 nM Natriumfluorid 20 nM Tris/Salzsäure pH 7,5 15 nM Natriumdiphosphat Lagerung bei 4°C
IP-Puffer	IP-Puffer Stammlösung + 0,25 nM Phenylmethylsulfonylfluorid + 2 mM Natriumorthovanadat

Tabelle 10 IP-Puffer Zusammensetzung

Pufferlösung	Rezeptur
Hypotoner Puffer A	10 mM Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethanesulfonsäure) pH 7,9, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Kaliumchlorid, 0,5 mM Dithiothreitol, 0,05% NP-40 und Proteaseinhibitoren
Hypertoner Puffer B	5 mM Hepes, pH 7,9, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 26% Glycerol, 300 mM Natriumchlorid und Proteaseinhibitoren

Tabelle 11 Pufferlösungen für die Zellfraktionierung

3.1.5. Material für Western Blot

Bestandteil	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
40% Acrylamide / Bis Lösung	5 ml	1,2 ml
doppelt destilliertes Wasser	5 ml	3,8 ml
Ammonium Persulfate	200 µg	100 µg
Tetramethylethylenediamine	30 µg	15 µg
Sammelgel-Puffer		5 ml
Trenngel-Puffer	10 ml	
Gesamtvolumen	20 ml	10 ml

Tabelle 12 Zusammensetzung des SDS-Gels

Pufferlösung	Rezeptur
Western Blot Laufpuffer Tris-Glycin-SDS-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) pH-Wert bei 8,3
Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol pH-Wert bei 8,3
Laemmli Puffer (1x)	2% SDS (Natriumdodecylsulfat) 10% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol oder 100mM Dithiothreitol 0,002% Bromphenolblau 62,5 mM Tris-Salzsäure, pH 6,8

Tabelle 13 Zusammensetzung der Western Blot Puffer

Bestandteil	Pipettievolumen Lösung 1	Pipettievolumen Lösung 2	Endgültige Konzentration
1M Tris/Salzsäure pH 8,5	2 ml	2 ml	100 mM
30% Wasserstoffperoxid		12 µg	1,5%
Luminol	200 µl		2,5 mM
Coumarinsäure	88 µl		0,4 mM
doppelt destilliertes Wasser	17,7 ml	18 ml	

Tabelle 14 Zusammensetzung der Elektrochemilumineszenz Reagenzien

3.1.6. Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Klonalität	Spezies	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
α-Fibrillarin	polyklonal	Kaninchen	Western-Blot	1:500	Abcam
α-FLAG(M2)	monoklonal	Maus	Western-Blot	1:10 000	Sigma
α-FLAG(M2)	monoklonal	Maus	Immunfluoreszenz	1:1000	Sigma
V5	monoklonal	Maus	Western-Blot	1:5000	Serotec
V5	polyklonal	Kaninchen	Immunfluoreszenz	1:1000	Sigam
α-14-3-3	polyklonal	Kaninchen	Western-Blot	1:10 000	Santa Cruz

Tabelle 15 Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Antikörper	Funktion	Spezies	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
α-Maus-Fc	HRP	Esel	Western-Blot	1:10 000	DAKO
α-Kaninchen-Fc	HRP	Esel	Western-Blot	1:10 000	Biochrom

Tabelle 16 Sekundärantikörper für Western Blot

Bezeichnung	Klonalität	Spezies	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
α-BrdU	monoklonal	Maus	FACS	10 µM	Sigma

Tabelle 17 Primärantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Markierung	Spezies	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
α-Maus-Fc	Alexa488	Esel	FACS	1:10 000	Jackson Immuno Research
α-Maus-Fc	Cy2	Esel	IF	1:500	Jackson Immuno Research
α-Kaninchen-Fc	Cy3	Esel	IF	1:500	Jackson Immuno Research

Tabelle 18 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie

3.1.7. Materialien für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bestandteil	Startmenge	Endkonz.	Reaktionsvolumen
DNA-Matrix			ca. 150 ng
5'- Primer	100 µl	0,6 µM	3 µl
3'- Primer	100 µl	0,6 µM	3 µl
Magnesiumsulfat	25 mM	2,25 mM	4,5 µl
Desoxyribonukleotidtri-phosphate (dNTPs)	10 mM	1 mM	5 µl
Betaine	100%	5%	2,5 µl
10x KOD-Puffer	10 x	1 x	5 µl
KOD Hot Start Polymerase	5 U/µl	0,1 U/µl	1 µl
doppelt destilliertes Wasser			ad 50 µl

Tabelle 19 Mastermix für PCR

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
hNPHP9	hNPHP9 fp	CTTCTTCACTGCCTGCCTGACT	Biomers
hNPHP9	hNPHP9 rp	GGCCTTCGCAGGCACAGGT	Biomers
HPRT1	HPRT1 fp	GACACTGGCAAAACAATGCA	Biomers
HPRT1	HPRT1 rp	GGTCCTTTCACCAGCAAGCT	Biomers

Tabelle 20 Real-Time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) Primer

3.1.8. Sequenzierung

Sequenzieransatz	Volumen bzw. DNA-Menge
Plasmid	500 ng
Primer	2 pmol
BigDye Mix	0,5 µl
Reaktionspuffer	2 µl
doppelt destilliertes Wasser	20 µl

Tabelle 21 PCR Ansatz für die Sequenzierung

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die in dieser medizinischen Dissertation beschriebenen Experimente wurden in den Zelllinien HEK293T, MCF10A und MCF7 durchgeführt. Durch lentiviralen Gentransfer gelang die Klonierung einer stabil F.TAZ exprimierenden Zelllinie. Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter strengen aseptischen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Zellen kultivierten in 10 cm Kulturschalen, die mit den entsprechenden Nährmedien beschickt waren (für detaillierte Herstellungsanweisungen siehe Tabelle 2). Bei der Subkultivierung wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*)-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin behandelt und für eine kurze Inkubationszeit im Brutschrank belassen, was die Zelladhäsionen löste. Die Trypsinbehandlung wurde durch die Zugabe von neuem Nährmedium gestoppt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Die auf diese Weise erhaltene Zellsuspension wurde auf 10 cm Kulturschalen oder 12-well Platten mit Glasplättchen für die nachfolgenden Experimente verteilt.

3.2.2. Plasmidklonierung

Die Kultivierung der *Escherichia coli* K12-Linien, die für die Plasmidklonierung verwendet wurden, erfolgte bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C unter Verwendung eines Luria-Bertani Nährmediums. Die Rezeptur für die verwendeten Nährmedien ist Tabelle 4 zu entnehmen. Für die positive Selektion der transformierten *Escherichia coli* Bakterien diente eine auf dem Vektor pcDNA6 integrierte Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker.

3.2.3. Transfektion mit Calciumphosphat

Im Überexpressionsmodell erfolgte eine transiente Transfektion der HEK293T-Zelllinien mittels Calciumphosphat-Transfektion. Dabei wurden subkultivierte HEK 293T-Zellen, mit einer Konfluenz von etwa 30%, mit 10-15 µg Plasmid-DNA pro Kulturschale versetzt. Für die Transfektion wurden 500 µl 0,25 M Calciumchlorid und Plasmid-DNA in einem Reaktionsgefäß vermischt und während kontinuierlicher Vortex-Behandlung wurden 500 µl 2x HEBS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) hinzugefügt. Die resultierende Lösung wurde anschließend tropfenweise auf die bereits subkultivierten Kulturschalen verteilt. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden standen die transfizierten Zellen für nachfolgende Experimente zur Verfügung. Die eingesetzten Plasmide wurden in Tabelle 7 aufgeführt.

3.2.4. Transfektion von siRNA mittels Oligofectamin

Die Transfektionsmethode unter Verwendung von Oligofectamin basiert auf einem lipidhaltigen Vektor, der *RNA* und *DNA* mittels Endozytoseprozessen in die Zielzellen überführt. In den folgenden Experimenten dienten MCF10A-Zellen als Modell und die Versuche erfolgten in 6 *well*-Platten mit einer Zielkonfluenz von 75% und einem Endvolumen von 0,75 ml. Die zur Transfektion benötigte *siRNA* wurde in vorbereitetes Opti-MEM Medium pipettiert und nach einer 5-minütigen Inkubationszeit mit Oligofectamin vermischt. Die entstandene transfektionsfähige Lösung wurde anschließend gleichmäßig über die Zielzellen distribuiert und für einen Zeitraum von 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Austausch des Nährmediums. Die spezifischen *siRNA*-Sequenzen, welche in diesen Versuchen Verwendung fanden, sind in Tabelle 8 aufgelistet. Das Prinzip der *RNA*-Interferenz basiert auf der spezifischen Bindung von kurzen *antisense RNA*-Molekülen an komplementäre *mRNA*-Abschnitte, was zum Abbau der *mRNA* und folglich zum Verlust des korrespondierenden Proteins führt.

3.2.5. Transfektion von Plasmiden mittels GeneJuice

Die Transfektionsmethode, unter Einsatz von GeneJuice, beruht auf zellulären Proteinen sowie Polyaminen und repräsentiert eine Kategorie des nicht-lipidbasierten *DNA*-Transfers. MCF10A-Zellen wurden im Verhältnis von 1:2 auf 12 *well*-Platten ausgesät und über Nacht bis zu einer Konfluenz von circa 80% inkubiert. Für jedes Konstrukt wurden 3 µl GeneJuice pro 1 µg *DNA* mit der zu transferierenden *DNA* und 100 µl Opti-MEM-Medium kombiniert. Nach einer Inkubationsphase von 20 Minuten wurde diese Mischung dem Kulturmedium hinzugefügt. Die Zellen wurden ohne Kulturmedienwechsel weiter inkubiert.

3.2.6. Transformation von Bakterien

Die Amplifikation von Plasmid-*DNA* wurde durch die Transformation chemokompetenter *Escherichia coli*-Stämme erreicht. Dazu wurden zuvor eingefrorene Bakterienaliquote und Plasmid-*DNA* im Verhältnis 10:1 (Bakterien zu Plasmid-*DNA*) gemischt. Diese Kombination wurde für 30 Minuten bei 0°C inkubiert, um die Zellmembran für die *DNA*-Aufnahme vorzubereiten. Anschließend wurde die Mischung einem thermischen Schock bei 42°C für eine Dauer von 45 Sekunden unterzogen, um die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen und die *DNA*-Aufnahme zu erleichtern. Diesem Schritt folgte eine rasche Abkühlung in einem Eisbad für zwei Minuten. Danach wurde das Inokulum mit 400 µl SOC-Medium angereichert und für eine Stunde bei 37°C und einer Rotationsgeschwindigkeit von 1000 U/min inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 2000 U/min für eine Dauer von 2 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Das resultierende Bakterienpellet wurde in 50 µl SOC-Medium resuspendiert. Die erzeugte bakterielle Suspension wurde daraufhin auf einer

Agarplatte für die Kultivierung ausgesät. Die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien erfolgte durch Kultivierung auf Agarplatten, die mit Ampicillin versetzt waren.

3.2.7. Lentiviraler Gentransfer

Durch den lentiviralen Gentransfer wurden stabil F.TAZ exprimierende MCF10A-Zelllinien erzeugt. Hierbei erfolgte zunächst die Klonierung der TAZ-Plasmid-cDNA in einen modifizierten pENTR1a Entry-Vektor, der später mittels Gateway-Technologie in den pLenti6/V5-Destination-Vektor rekombiniert wurde. Für die Produktion des Lentivirus wurden HEK 293T-Zellen mit dem rekombinierten F.TAZ pLenti6/V5-Plasmid sowie den unterstützenden Virushilfsplasmiden pMDL g/p, pMDS2 vsvG und pRSV kotransfiziert. Während der Inkubationsphase replizierte das Virus im Zellkulturmedium. Der anschließend gewonnene Zellüberstand wurde durch Zentrifugation und Filtration mittels eines 0,45 µm Filters aufgearbeitet. Dieses aufbereitete Virus wurde über einen Zeitraum von 12 Stunden mit den MCF10A-Zellen inkubiert. Als Kontrollindikator für eine erfolgreiche Transduktion wurde das grün fluoreszierende Protein (*Green Fluorescent Protein*) verwendet. Zusätzlich wurde eine Transduktion mit einem Leervektor als Kontrolle für nachfolgende experimentelle Anwendungen durchgeführt. Die Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen erfolgt unter Anwendung von 10 mg/ml Blasticidin. Alle Arbeitsschritte wurden unter den Bedingungen eines S2-Labors durchgeführt.

3.2.8. Immunopräzipitation (IP)

Durch eine Immunopräzipitation können Proteine und ihre physikalisch gebundenen Partner mittels Antikörper präzipitiert und im Anschluss identifiziert werden. Nach erfolgreicher Transfektion wurden die Zellen mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) geerntet und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß transferiert, das auf Eis gelegt wurde. Ein Aliquot von 1 ml der geernteten Zellsuspension wurde unter definierten Bedingungen zentrifugiert (13 200 U/min, 15 Minuten, 4°C). Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das verbleibende Zellpellet wurde mit 60 µl 1x Laemmli-Puffer sowie Dithiothreitol (DTT) behandelt. Dieses Gemisch wurde für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Das resultierende Gesamtzelllysat wurde unmittelbar für die Western-Blot-Analyse verwendet und wurde bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden.

Der verbleibende Anteil der suspendierten Zelllösung wird einer weiteren Zentrifugation unterzogen (1000 U/min, 5 Minuten, 4°C), wobei der Überstand verworfen wird. Im nächsten Schritt erfolgt die Lyse der Pellets mittels IP-Puffer für eine Dauer von 15 Minuten bei 4°C.

Dies wird gefolgt von einer weiteren Zentrifugation (1.000 U/min, 5 Minuten, 4°C). Aus dem resultierenden Lysat wird ein spezifiziertes Aliquot von 30 µl entnommen und zusammen mit 30 µl 2x Laemmli-Puffer sowie Dithiothreitol (DTT) in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Dieses Gemisch wird für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend für die Western-Blot-Analyse verwendet und bei -20°C gelagert. Die Proteine werden durch Erhitzen von 95°C für 5 Minuten denaturiert. Der übrige Teil wird für die Immunpräzipitation verwendet und mit 30 µl antikörpergekoppelten Beads beladen und für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert.

Nach der Durchführung einer Zentrifugation unter den spezifizierten Bedingungen von 1000 U/min für eine Dauer von 3 Minuten bei einer Temperatur von 4°C wird der Überstand sorgfältig entfernt. Das zurückbleibende Pellet, welches sowohl die präzipitierten als auch die kopräzipitierten Proteine enthält, wird daraufhin mittels Lysepuffer in einer dreifachen Waschprozedur behandelt und erneut zentrifugiert. Abschließend erfolgt die Rekonditionierung der Pellets durch die Zugabe von 30 µl 2x Laemmli-Puffer sowie DTT und einer anschließenden Inkubation für 5 Minuten bei einer Temperatur von 95°C. Die Probe kann für die Western-Blot-Analyse verwendet werden und kann bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden.

3.2.9. Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung dient der Auftrennung von Zelllysaten in Zytoplasma und Nukleoplasma durch Zentrifugation. Nach der Trennung ermöglicht die Western-Blot-Analyse die Bestimmung der subzellulären Lokalisation der zu untersuchenden Proteine.

Zunächst erfolgte die Ernte der über Nacht transient transfizierten Zellen in 6 ml kalter Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS). Ein Aliquote von 1 ml wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und unter den Bedingungen von 10.000 U/min für 3 Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit einer Lösung aus 60 µl 1x Laemmli-Puffer und DTT versetzt. Eine nachfolgende Inkubation für 10 Minuten bei einer Temperatur von 95°C wurde durchgeführt, um ein Gesamtzelllysat herzustellen. Die Probe kann für die Western-Blot-Analyse verwendet werden und kann bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden.

Die verbleibenden 5 ml der Zellernte wurden zentrifugiert (600 U/min, 5 min, 4°C). Der dabei entstandene Überstand konnte verworfen werden und das resultierende Pellet wurde im Anschluss mit Puffer A (920 µl Puffer A + 40 µl 25x PIM + 40 µl NaVO₄) resuspendiert. Nach

einer 10-minütigen Inkubation erfolgte das Auf- und Abpipettieren mittels einer 20G-Kanüle (20 Mal), um die zytosolische Fraktion freizusetzen.

Daraufhin erfolgt eine Zentrifugation (1 200 U/min, 30 min, 4°C), durch welche der Überstand gewonnen wird, der nun die zytosolische Fraktion und Anteile der Zellmembran enthält. Durch Ultrazentrifugation (45 000 U/min, 60 min, 4°C) werden die Zellmembrananteile entfernt und das entstehende Pellet verworfen. 40 µl des Überstandes werden entnommen und mit 40 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

Parallel dazu wird das Pellet, das die nukleäre Fraktion darstellt, in 1 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert (10 000 U/min, 15 min, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wird das verbleibende Pellet in 100 µl Puffer B (920 µl Puffer B + 40 µl 25x PIM + 40 µl NaVO₄) und 6,4 µl 4,3 M NaCl-Lösung versetzt und einer Sonifizierung (Bandelin; Power 44%, 20x: 0,7 Sekunden Impuls, 0,3 Sekunden Pause) unterzogen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis werden 40 µl entnommen, mit 40 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

Schließlich erfolgt eine Western-Blot-Analyse. Zur Beurteilung der Trennqualität werden die beiden Fraktionen mit Anti-14-3-3 (zytosolische Fraktion) und Anti-Fibrillarin (nukleäre Fraktion) Antikörpern gefärbt.

3.2.10. Proteinbiochemie mit Western Blot SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) stellt ein analytisches Verfahren dar, das die Trennung denaturierter Proteine in Abhängigkeit ihrer molekularen Größe unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ermöglicht. Im Anschluss an diese elektrophoretische Trennung werden die Proteine durch die Western-Blot-Technik auf einer spezifischen Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran immobilisiert, ein Prozess der als "Blotting" bezeichnet wird. Nach der Immobilisierung erfolgt die Detektion der Zielproteine mittels antikörperbasierter Techniken, die eine spezifische Visualisierung ermöglichen.

Die Rezeptur für die Zusammensetzung der verschiedenen Gele ist in Tabelle 10 detailliert aufgeführt. Bei der Herstellung des Trenngels werden sämtliche Komponenten bis auf Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) in einem Reaktionsgefäß gemischt. Die Polymerisationsreaktion wird durch die Zugabe von APS und TEMED initiiert. Das resultierende flüssige Trenngel wird in eine dafür vorgesehene Plastikgelkassette überführt und anschließend mit Isopropanol bedeckt. Eine Inkubationsphase bei Raumtemperatur ermöglicht die Aushärtung des Gels. Nach dem Aushärten wird das Isopropanol sorgfältig dekantiert. Das Sammelgel, nun ebenfalls mit APS

und TEMED versetzt, wird in die bestehende Plastikgelkassette gegossen. Ein Plastikkamm wird eingesetzt, um Ladetaschen für die Proben im Gel zu erzeugen.

Die elektrophoretische Trennung erfordert die Anwendung von zwei verschiedenen Amperemeter-Einstellungen für die jeweiligen Gelphasen. Im Sammelgel wird eine Spannung von 70 V für eine Zeitspanne von 30 Minuten eingestellt, um eine effiziente Konzentration der Proteine zu ermöglichen. Im darauffolgenden Trenngel wird die Stromstärke auf 25 mA eingestellt und über eine Dauer von 2 Stunden aufrechterhalten, um einen optimalen Trennprozess der Proteine nach ihrer Molekülgröße zu gewährleisten.

Das primäre Ziel des Semi-dry-Blotting-Verfahrens ist die elektrophoretische Übertragung der Proteine, die nach Durchführung der SDS-PAGE im Trenngel lokalisiert sind, auf eine PVDF-Membran. Dieser Transferprozess erfolgt mittels eines elektrischen Feldes, welches die gerichtete Wanderung der Proteine vom Trenngel auf die PVDF-Membran induziert.

Nach der Applikation des denaturierten Lysats auf ein SDS-PAGE-Gel und der anschließenden elektrophoretischen Trennung durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurde der Blotting-Prozess eingeleitet. Zwei Whatman-Papierstreifen mit einer Stärke von 3 mm wurden in Transferpuffer getränkt. Einer dieser getränkten Whatman-Papierstreifen wurde auf die Graphit-Anode der Transferkammer gelegt. Darauffolgend wurde die PVDF-Membran positioniert, die vorher in Methanol equilibriert worden war. Das Trenngel wurde als nächstes sorgfältig auf diese PVDF-Membran aufgebracht, gefolgt von dem zweiten in Transferpuffer getränkten Whatman-Papier. Nach dem Verschluss der Transferkammer, bei dem der Deckel als Kathode fungiert, wurde der Proteintransfer unter einer Spannung von 12 V für eine Dauer von 53 Minuten durchgeführt. Dieser Prozess resultiert in einer PVDF-Membran, auf der die Proteine aus dem Gel fixiert sind und die nun für die Detektion mittels spezifischer Antikörper in der Western-Blot-Analyse vorbereitet sind.

Nach dem Abschluss des Transfers wurde die PVDF-Membran für 60 Minuten bei 37°C in einer 5%igen Lösung von Bovinem Serumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper wurde bevorzugt über Nacht bei einer Temperatur von 4°C oder alternativ für eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach dieser Phase wurde die Membran in Waschpuffer bei Raumtemperatur dreifach gespült, jeweils für 5 Minuten. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper bei Zimmertemperatur. Nach zusätzlichen 3 Waschzyklen wurde die Membran mit einer ECL-Lösung (*Enhanced Chemiluminescence*, ECL) benetzt, schließlich die Lumineszenz durch die Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP) ausgelöst und mittels eines digitalen Kamerasystems (Fusion, Peqlab) visualisiert und digital festgehalten.

3.2.11. Immunfloreszenzfärbung

Das Ziel der Immunfluoreszenz-Färbung ist es, die subzelluläre Verteilung diverser Proteine optisch sichtbar zu machen. Dabei kommen Antikörper zum Einsatz, die an Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind. Diese erlauben die differenzierte Betrachtung von verschiedenen zellulären Bereichen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zur Lokalisierung des Zellkerns wird 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) als Färbemittel eingesetzt. MCF10A-Zellen werden auf Deckgläsern gezüchtet und bei einer Konfluenz von ungefähr 75% für eine begrenzte Zeit transfiziert.

Nach dem Abschluss der Inkubations- und Synchronisationsphase werden die Zellen mit PBS gespült und danach durch eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur stabilisiert. Im Anschluss daran werden die Zellen dreimal mit Dulbecco's PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, werden sie mit 5% normalem Eselsserum (*Normal Donkey Serum*; NDS) in 1x PBS für wenigstens 60 Minuten bei Zimmertemperatur behandelt.

Der eingesetzte Primärantikörper wird in Dulbecco's PBS präpariert und für jedes Deckglas (Durchmesser 18 mm) werden 100 µl der verdünnten Antikörperlösung angewendet. Eine Inkubation von einer Stunde bei Zimmertemperatur schließt sich an, danach erfolgt ein Waschzyklus in dreifacher Ausführung. Anschließend werden die Deckgläser für eine halbe Stunde in einer abgeschirmten Färbekammer mit einem an Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Sekundärantikörper behandelt.

Nach zusätzlichen drei Waschzyklen werden die Deckgläser mittels eines Tropfens Einbettmediums auf Objekträgern fixiert. Im Rahmen dieses Verfahrens erfolgt ebenfalls die Kontrastfärbung des Zellkerns mittels DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich für die DNA-Färbung eignet. Sobald das Einbettmedium bei Zimmertemperatur fest geworden ist, werden die Objekträger lichtgeschützt aufbewahrt und können mittels eines Axiovert 200 Mikroskops (Zeiss) unter Einsatz diverser Filter untersucht werden.

3.2.12. Durchflusszytometrie

Das Ziel einer Analyse mit Bromodeoxyuridin (5-Bromo-2-Deoxyuridin, BrdU) ist es, proliferative Zellen durch den Einsatz von Durchflusszytometrie zu identifizieren. Das Kernprinzip dieser Methode basiert auf der Detektion verschiedener Lichtemissionen sowie

des Vorwärts- und Seitwärtsstreuulichts, um vielfältige Zellgruppen zu erfassen. Mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper ist es möglich, bestimmte Epitope sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle zu markieren und zu identifizieren.

Bromodeoxyuridin wird von Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, als Ersatz für Thymidin während der *DNA*-Synthese aufgenommen. Durch den Einsatz eines Anti-BrdU-Antikörpers lassen sich solche Zellen kennzeichnen und mittels Durchflusszytometrie quantitativ erfassen. Zelllinien wie MCF10A, F.TAZ MCF10A und MCF7 wurden via Oligofectamine-Technik mit *siRNA* (Endkonzentration von 20 nM) transfiziert. Nach einer Inkubationsphase von drei Stunden mit Bromodeoxyuridin erfolgte die Fixierung der Zellen in 70%igem Ethanol. Am Folgetag wurden die fixierten Zellen mit einer Lösung aus 2 N Salzsäure, 0,5% Triton X-100 und 0,1 M Natriumtetraborat behandelt. Das integrierte Bromodeoxyuridin wurde mit einem Anti-BrdU-Antikörper gekennzeichnet (100 µl des monoklonalen Anti-BrdU-Antikörpers in einer Verdünnungslösung, zwei Stunden Inkubation) und anschließend an Alexa 488 anti-Maus-IgG als Sekundärantikörper gebunden. Die Verdünnungslösung setzte sich aus PBS (pH 7,2-7,4) mit 1% BSA, 0,5% Tween 20 und 0,1% Natriumazid zusammen. Die Zellkerne wurden durch Färbung mit Propidiumiodid hervorgehoben. Abschließend fand eine durchflusszytometrische Analyse statt.

3.2.13. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion dient als ein Verfahren der Molekularbiologie zur selektiven und umfangreichen Vermehrung bestimmter *DNA*-Segmente. Dies wird durch den Einsatz kurzer *DNA*-Oligonukleotide, auch als Primer bekannt, und einer temperaturabhängigen *DNA*-Polymerase realisiert. Ein Thermocycler von MJ (PTC-200) kam für die Umsetzung der PCR-Reaktionen zum Einsatz. Dieser Prozess wird mehrfach wiederholt, um eine exponentielle Verstärkung des beabsichtigten *DNA*-Bereichs zu erzielen. Die vervielfältigten *DNA*-Stücke können danach durch Agarosegelektrophorese separiert und sichtbar gemacht werden.

Die Real-Time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) stellt eine erweiterte Variante der klassischen PCR dar und bietet zusätzlich die Möglichkeit, die vervielfältigte *DNA* zu quantifizieren. Der Basisprozess der *DNA*-Amplifikation bleibt im Grundsatz gleich, wird jedoch durch die Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs erweitert. Dieser Farbstoff bindet sich an die doppelsträngige *DNA* und wird während des Amplifikationsprozesses in Proportion zur Menge des erzeugten Amplifikats eingefügt. Nach jedem Amplifikationszyklus wird die Fluoreszenzintensität erfasst. Da die Intensität der Fluoreszenz mit der Anzahl der vorliegenden doppelsträngigen *DNA*-Stücke in Verbindung steht, ermöglicht die Messung eine Schätzung der Menge des erzeugten Amplifikats.

Für den relativen Vergleich der Mengen in den Ergebnissen wurde zusätzlich ein Referenz- oder *Housekeeping*-Gen koamplifiziert. In dieser speziellen Studie fungierte das Gen *HPRT1* als solches Vergleichsgen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	20 sec	Repetition 30-32mal
Hybridisierung	59°C	30 sec	
Elongation	68°C	45 sec	
Kühlung	8°C	∞	

Tabelle 22 Amplifikationsprotokoll

3.2.14. Verdau mittels Restriktionsenzymen

Die Spaltung von *DNA* oder PCR-Ergebnissen durch Restriktionsenzyme war ein unverzichtbarer Vorgang in molekularbiologischen Studien, insbesondere im Hinblick auf die Präparation von Zielvektoren und Plasmiden für Klonierungs- und Ligationsverfahren oder als Qualitätssicherung nach der Verstärkung und Aufbereitung von Plasmiden. Für diesen Vorgang wurden ausgewählte Restriktionsenzyme eingesetzt, die in der Lage waren, *DNA* an speziellen Sequenzen, auch als Restriktionssites bekannt, zu zerteilen. Daraus resultierten *DNA*-Segmente unterschiedlicher Länge, die anschließend durch Elektrophorese separiert und beurteilt werden konnten. Die *DNA*-Inkubation mit den Restriktionsenzymen bei 37°C dauerte etwa eine Stunde.

3.2.15. Dephosphorylierung von Vektor *DNA*

Um eine Wiederanlagerung der Vektor-*DNA* nach der Spaltung durch Restriktionsenzyme zu vermeiden, wurde die linearisierte *DNA* durch den Einsatz einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Dieser Schritt umfasste das Hinzufügen von einer Einheit (1U) Antarctic Phosphatase zum Restriktionsverdau-Mix und eine Inkubationsphase bei 37°C für etwa 30 Minuten. Zur Inaktivierung der weiteren Phosphatase-Aktivität wurde die Mischung auf 65°C für 10 Minuten erhitzt.

3.2.16. Elektrophorese im Agarosegel

Die Dimensionierung von *DNA*-Segmenten wurde durch ihre elektrophoretische Trennung in Agarosegelen erreicht. Hierfür wurde ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 0,5-2% (w/v) in 1x TAE-Puffer verwendet, welches mit 0,005% Ethidiumbromid-Lösung angereichert war. Die Trennung der Segmente fand bei einer elektrischen Spannung im Bereich von 80 bis 100 V statt.

3.2.17. Aufreinigung von *DNA*-Fragmenten

Nach enzymatischem Schnitt und elektrophoretischer Trennung wurden die *DNA*-Segmente unter UV-Beleuchtung aus dem Gel extrahiert. Die Isolierung der *DNA*-Segmente erfolgte danach durch Verwendung des GeneJet Plasmid Miniprep-Kits von Fermentas, entsprechend der vom Produzenten vorgegebenen Anleitung.

3.2.18. Ligation von *DNA*-Fragmenten

Die Einbringung von *DNA*-Segmenten in einen vorab geschnittenen Zielvektor geschah durch eine T4-Ligase-Reaktion, die über 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt wurde.

3.2.19. Plasmidpräparation

Um Plasmid-*DNA* zu amplifizieren, wurden bereits transformierte Bakterien in angereicherten Kulturen gezüchtet und über Nacht bei 37°C mit 120 U/min inkubiert. Anschließend wurde die vervielfältigte Plasmid-*DNA* durch das STET-Prep-Verfahren isoliert. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch eine Restriktionsenzym-Auswertung und bei neu geklonten Strukturen zusätzlich durch Sanger-Sequenzanalyse.

3.2.20. Plasmidpräparation mit STET-Puffer

Die Plasmidextraktion mittels der ökonomischen STET-Puffer-Methode beginnt mit der Überführung von 1,5 ml transformierter bakterieller Suspension in ein Zentrifugenrörchen. Diesem Schritt folgt eine Zentrifugation bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 8.000 U/min über einen Zeitraum von 60 Sekunden. Im Folgenden erfolgt die Entfernung des Überstands, und das resultierende Bakterienpellet wurde in 300 µl der STET1-Lösung resuspendiert, gefolgt von einer Homogenisierung durch Vortexen. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 25 µl eines Lysozym-enthaltenden STET2-Puffers und einer anschließenden Inkubation bei 95°C für drei Minuten. Um den Zellabfall zu entfernen, wurde eine Zentrifugation bei 13 200 U/min für eine Viertelstunde durchgeführt. Die isolierte *DNA* wurde dann in 300 µl Isopropanol neu resuspendiert und bei 13 200 U/min für weitere acht Minuten zentrifugiert. Nach einer Ethanol-Spülung und dem Lufttrocknen wurde das Pellet in 30 µl *RNA*se-freiem Wasser resuspendiert. Abschließend wurde die Qualität der Präparation mittels einer Restriktionsenzym-Analyse evaluiert.

3.2.21. Sequenzierung

Für die Qualitätsprüfung wurden frisch klonierte Plasmide mithilfe der Sanger-Sequenzierung, auch bekannt als Kettenabbruchmethode, untersucht. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Mastermix aus BigDye, Taq-Polymerase und fluoreszierenden Nukleotiden kombiniert und an der Einrichtung für Genomik (*Cologne Center for Genomics* - CCG) der Universitätsklinik Köln sequenziert. Die Analyse erfolgte computergestützt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Interaktion der ziliären Proteine NPHP4 und NPHP9

Auf Grundlage der vorliegenden Daten, die NPHP4 als Regulator der Hippo-Signalkaskade identifizieren, wurden zahlreiche gezielte Experimente durchgeführt, um potenzielle Interaktionspartner von NPHP4 und deren Einfluss auf die Hippo-Kaskade zu charakterisieren. Dabei fanden wir eine potentielle Interaktion zwischen NPHP4 und NPHP9. Dazu wurde eine Koinmunpräzipitation von V5.NPHP4 unter Verwendung von F.NPHP9 mit anti-FLAG Antikörpern durchgeführt. F.Eps diente als Negativkontrolle. Abbildung 1A zeigt die Kopräzipitation von V5.NPHP4 mit F.NPHP9, was die Einbindung in einen gemeinsamen Proteinkomplex nahelegt. Bei der Präzipitation von F.Eps wurde V5.NPHP4 hingegen nicht detektiert. Expressionskontrollen bestätigten die Expression der Proteine F.NPHP9, V5.NPHP4 und F.Eps in den Lysaten. Ergänzend dazu wurde, wie exemplarisch in Abbildung 1B gezeigt, eine reziproke Interaktion mittels anti-FLAG Präzipitation von F.NPHP4 und V5.NPHP9 verifiziert; eine Präzipitation von V5.NPHP9 mit F.Eps erfolgte nicht. Somit legen die wechselseitigen Kopräzipitationen nahe, dass NPHP4 und NPHP9 Teil eines gemeinsamen Proteinkomplexes sein könnten.

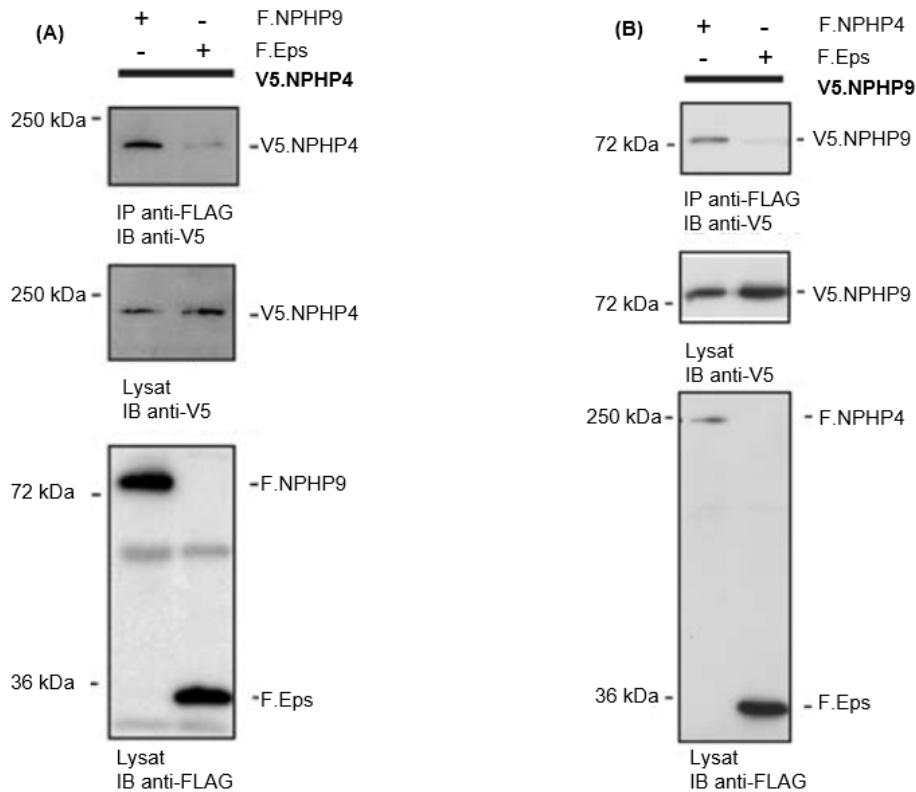


Abbildung 1 Koimmunpräzipitation von NPHP9 und NPHP4

(A) Kotransfektion von V5.NPHP4 mit F.NPHP9 oder F.Eps und Präzipitation anti-FLAG. Spur 1 zeigt eine deutliche Interaktion zwischen F.NPHP9 und V5.NPHP4. In Spur 2 hingegen kann keine Interaktion zwischen F.Eps und V5.NPHP4 nachgewiesen werden. In den Lysaten zeigten sich gleichmäßige Proteinlevel von F.NPHP9, F.Eps und V5.NPHP4, die mittels monoklonaler Antikörper nachweisbar waren. (B) Kotransfektion von V5.NPHP9 mit F.NPHP4 oder F.Eps und Präzipitation anti-FLAG. Spur 1 zeigt eine deutliche Interaktion zwischen F.NPHP4 und V5.NPHP9. In Spur 2 hingegen kann keine Interaktion zwischen F.Eps und V5.NPHP9 nachgewiesen werden. In den Lysaten waren F.NPHP4, F.Eps und V5.NPHP9 mittels monoklonaler Antikörper nachweisbar.

4.2. Stabilisierung von nukleärem TAZ durch NPHP4 und NPHP9

In vorangegangenen Experimenten haben wir NPHP9 als einen neuen möglichen Bindungspartner für NPHP4 identifiziert und konnten die Assoziation beider Proteine in Koimmunpräzipitationsexperimenten zeigen. Aus der wissenschaftlichen Literatur geht hervor, dass NPHP4 primär am primären Zilium und im Zytosol zu finden ist, während NPHP9 sowohl zytosolisch als auch nuklear lokalisiert ist. In Anbetracht der Tatsache, dass NPHP4 die Phosphorylierung von TAZ durch die Kinase LATS in der Regulation der Hippo-Kaskade hemmt und damit die Translokation von TAZ begünstigt¹⁰⁷, zielten folgende Zellfraktionierungs-Experimente darauf ab, zu untersuchen, ob NPHP4 die subzelluläre Lokalisierung von NPHP9 beeinflussen könnte. Abbildung 2A verdeutlicht, dass in der Anwesenheit von F.NPHP4 eine Anreicherung von F.NPHP9 im Zellkern im Vergleich zum

Kontrollprotein F.Eps stattfindet. F.Eps diente erneut als Negativkontrolle, da bisher keine Interaktion zwischen F.Eps, F.NPHP4 und F.NPHP9 beschrieben wurde.

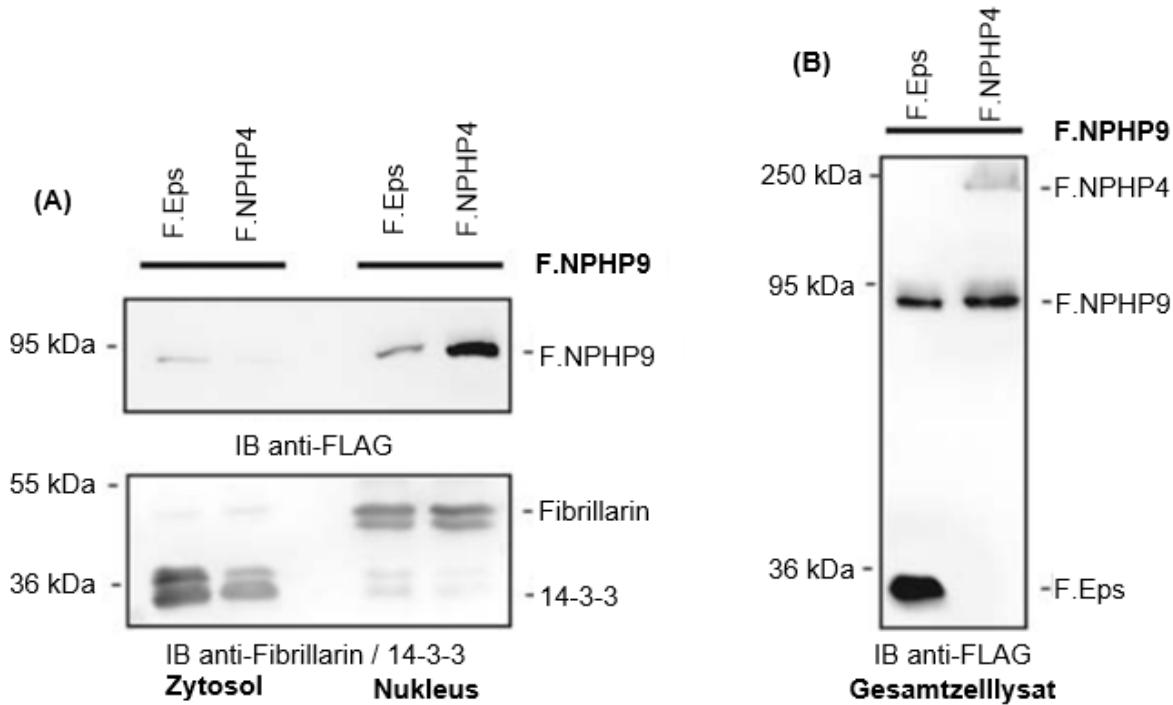


Abbildung 2 Der Einfluss von NPHP4 auf die Lokalisation von NPHP9 im Zellfraktionierungsassay

(A) Zellfraktionierung. In den Spuren 1 und 3 zeigt sich bei gleichzeitiger Expression von F.Eps und F.NPHP9 sowohl eine zytosolische als auch eine nukleäre Lokalisation von F.NPHP9. In den Spuren 2 und 4 ist bei gleichzeitiger Expression von F.NPHP4 und F.NPHP9 ein deutliches nukleäres Signal von F.NPHP9 zu erkennen. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch Färbung von 14-3-3 (zytosolische Fraktion) und Fibrillarin (nukleäre Fraktion) bestimmt. (B) Gesamtlysate. Alle Proteine zeigen sich im Gesamtzelllysat als exprimiert.

Sowohl NPHP9 als auch TAZ können in verschiedenen zellulären Kompartimenten, speziell im Zytosol sowie im Zellkern, detektiert werden. Dies erlaubt die Hypothese, dass bei der gleichzeitigen Expression von F.NPHP9 und F.TAZ eine Stabilisierung oder Anreicherung von TAZ im Nukleus stattfindet. Dazu führten wir Zellfraktionierungsexperimente durch unter Expression von TAZ mit und ohne NPHP9 (Abbildung 3A). Die Stabilisierung von TAZ erfolgt durch eine signifikante Translokation von F.TAZ aus der zytosolischen in die nukleäre Fraktion in Anwesenheit von NPHP9, während die Gesamtproteinexpression unbeeinflusst bleibt. F.Eps wurde wieder, aufgrund seiner bereits beschriebenen Eigenschaften, als Kontrollprotein verwendet.

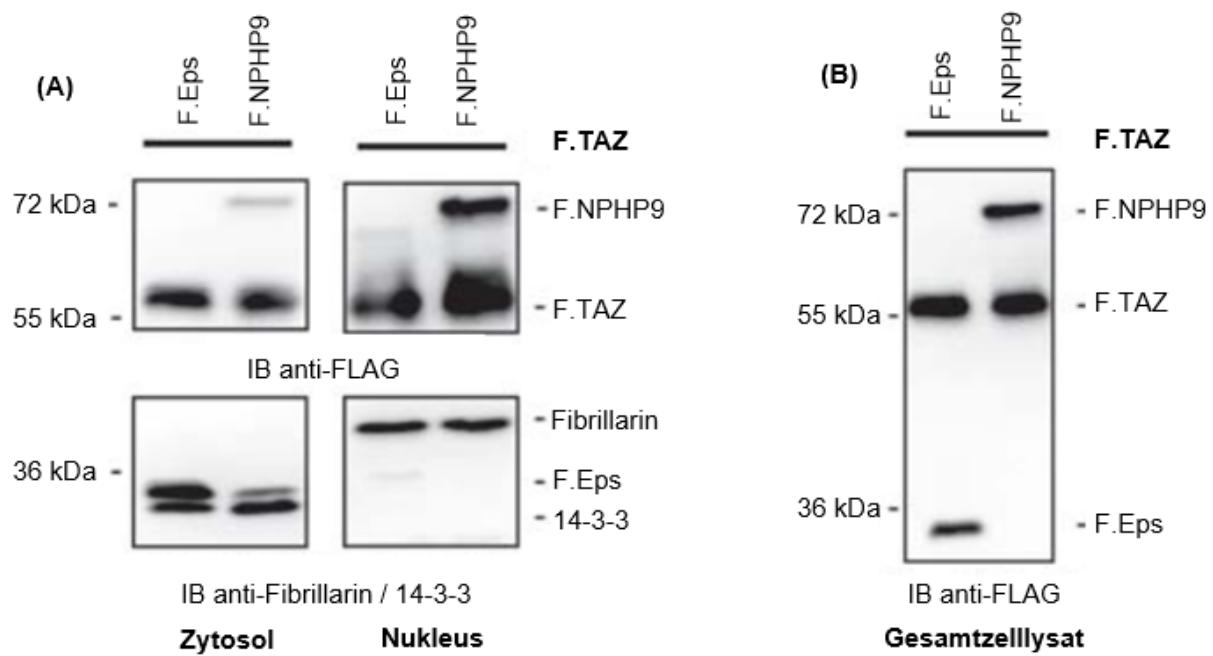


Abbildung 3 Zellfraktionierung zur Analyse der TAZ Lokalisation in Abhangigkeit von NPHP9

(A) Zellfraktionierung: In den Spuren 1 und 3 ist bei gleichzeitiger Expression von F.Eps und F.TAZ sowohl eine zytosolische als auch eine nukleäre Lokalisation von F.TAZ zu sehen. Die Lokalisation von F.Eps wurde dabei nicht beeinflusst. In den Spuren 2 und 4 zeigt sich bei gleichzeitiger Expression von F.NPHP9 und F.TAZ ein deutliches nukleäres Signal sowohl von F.TAZ als auch von F.NPHP9. In Spur 2 zeigt sich eine Abnahme des F.TAZ-Signals in der zytosolischen und eine Zunahme in der nukleären Fraktion in der Western-Blot-Analyse. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch Färbung von 14-3-3 (zytosolische Fraktion) und Fibrillarin (nukleäre Fraktion) bestimmt. (B) Gesamtlysate: Alle Proteine zeigten sich im Gesamtzelllysat als exprimiert.

Um die Validität unserer Zellfraktionierungsergebnisse zu untermauern, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen an MCF10A Zellen durchgeführt (Abbildung 4). Bei einzelner Expression der betreffenden Konstrukte zeigt sich für F.NPHP9 sowie für F.TAZ eine überwiegend zytosolische Verteilung, charakterisiert durch die deutlich ersichtliche Aussparung des Zellkerns in der Fluoreszenzdarstellung. Bei simultaner Expression von F.TAZ und F.NPHP9 zeigt sich eine zunehmende nukleäre Signalintensität, was die Hypothese unterstützt, dass eine gegenseitige Stabilisierung von F.NPHP9 und F.TAZ im nukleären Kompartiment stattfindet.

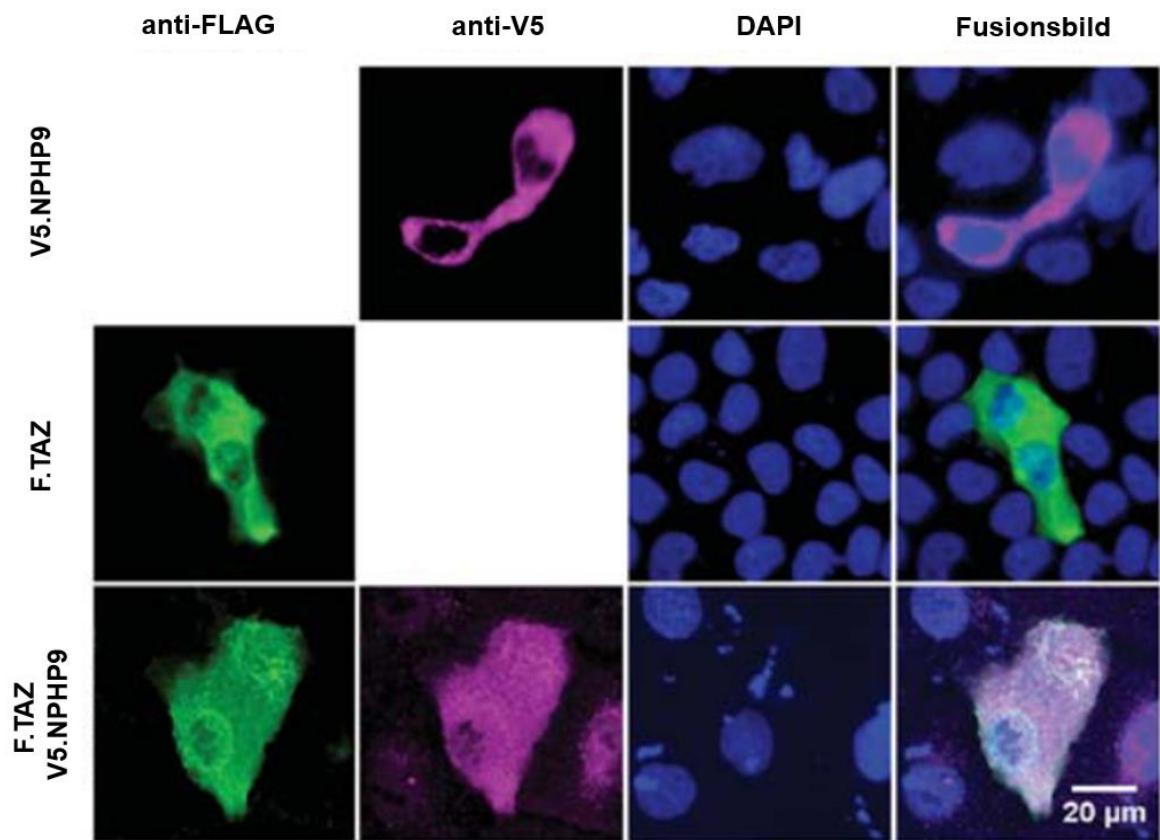


Abbildung 4 Immunfluoreszenz Färbung von MCF10A Zellen mit Koexpression von F.TAZ und V5.NPHP9

Die Färbung erfolgt mit monoklonalen FLAG-Antikörpern und einem polyklonalen V5-Antikörper. Als Sekundärantikörper kamen ein Cy2-konjugierter Anti-Maus-IgG, der ein grünes Signal erzeugt, sowie ein Cy3-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG, der ein rotes Fluoreszenzsignal erzeugt, zum Einsatz. Für die Färbung des Zellkerns wurde DAPI verwendet.

4.3. Verlust von NPHP9 führt zu einer verminderten mitotischen Aktivität in TAZ transformierten Brustkrebszellen

Angesichts der Rolle von TAZ als potentem Regulator der Zellproliferation und Tumorgenese *in vivo* wurde der Einfluss von NPHP9 in diesem Kontext untersucht. Im Folgenden wurden funktionelle Studien durchgeführt und dazu stabile Zelllinien generiert, die das Protein F.TAZ mittels lentiviralem Gentransfer stabil exprimierten. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die mit einem Leervektor transduziert wurden. Die Integration von Bromodeoxyuridin (BrdU), einem Marker für die mitotische Aktivität der Zellen, wurde anschließend analysiert. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die stabile TAZ-Expression eine signifikant höhere Anzahl von BrdU-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzeigte (Abbildung 5A). Zur weiteren Untersuchung wurden zwei verschiedene NPHP9-spezifische *siRNAs* entwickelt und ihre Wirksamkeit mittels qPCR bestätigt. Der *siRNA*-vermittelte Knockdown von NPHP9 resultierte in einer signifikanten Reduktion der NPHP9-mRNA-Level im Vergleich zu Kontroll *siRNA* (Abbildung 5B).

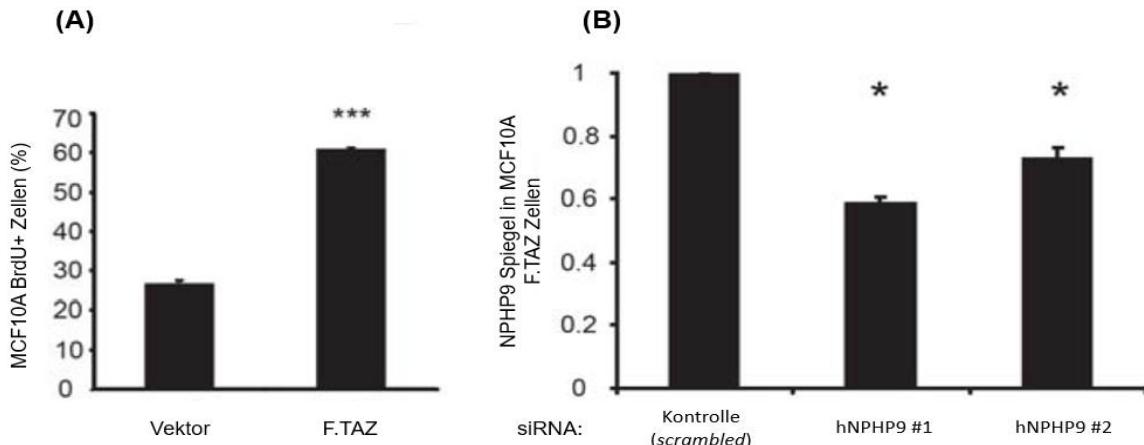


Abbildung 5 Proliferationsanalyse von MCF10A-Zellen mit stabiler TAZ-Überexpression und Validierung der NPHP9 siRNA mittels qPCR in den gleichen Zellen

(A) Stabile Expression von F.TAZ in MCF10A Zellen führt zu einem Anstieg der BrdU-positiven Zellen auf bis zu 60% im Vergleich zum Leervektor (n=3, ***, P<0,05). (B) Die Effizienz der NPHP9-siRNAs wurde mittels SYBR Green-qPCR bestätigt. HPRT1 diente als endogene Kontrolle. Alle qPCR-Experimente wurden auf dem ABI 7900HT-System durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der endogenen NPHP9-Spiegel im Vergleich zur mit Kontroll-siRNA behandelten Probe (n=3; *, P<0,05). Die in der Abbildung 5B dargestellten Fehlerbalken repräsentieren das Standardfehler des Mittelwerts (n=3, *, P<0,05).

In der anschließenden Untersuchung fokussierten wir uns auf die Auswirkungen einer negativen Regulation von NPHP9 in TAZ-exprimierenden Zelllinien. Zu diesem Zweck nutzten wir die oben beschriebenen F.TAZ-exprimierenden MCF10A-Zellen. Nach der Behandlung der F.TAZ-exprimierenden MCF10A-Zellen mit zwei verschiedenen siRNAs gegen NPHP9 beobachteten wir eine signifikante Abnahme der mitotisch aktiven Zellen im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Zwischen den beiden eingesetzten siRNAs zeigte hNPHP9 #2 eine überlegene Effizienz im Vergleich zu hNPHP9 #1. Eine Suppression der NPHP9-Expression resultierte in einer Abnahme der BrdU-positiven Zellen um 30% bis 40% im Vergleich zur siRNA-Kontrolle (Abbildung 6A). Um auszuschließen, dass NPHP9 einen Einfluss auf die Expression von F.TAZ ausübt, analysierten wir die Proteinexpression mittels Western-Blot-Verfahren. Als Ladekontrolle diente 14-3-3, dass ebenfalls keinen Unterschied in der Expression zeigte. In unserem abschließenden Experiment (Abbildung 6B) untersuchten wir, ob der antiproliferative Effekt auch in TAZ-dysregulierten Brustkrebszellen (MCF7) nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mittels siRNA gegen NPHP9, TAZ und eine Kontroll-siRNA behandelt. Die stärkste antiproliferative Wirkung in den MCF7-Zellen wurde durch die Inhibition von F.TAZ erzielt, mit einer Reduktion von bis zu 30% BrdU-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Suppression von NPHP9 zeigte einen ähnlichen, jedoch weniger ausgeprägten Effekt auf die mitotisch aktiven Zellen. Darüber hinaus wies

hNPHP9 #2 eine bessere, wenn auch nicht signifikante, Effizienz im Vergleich zu hNPHP9 #1 auf.

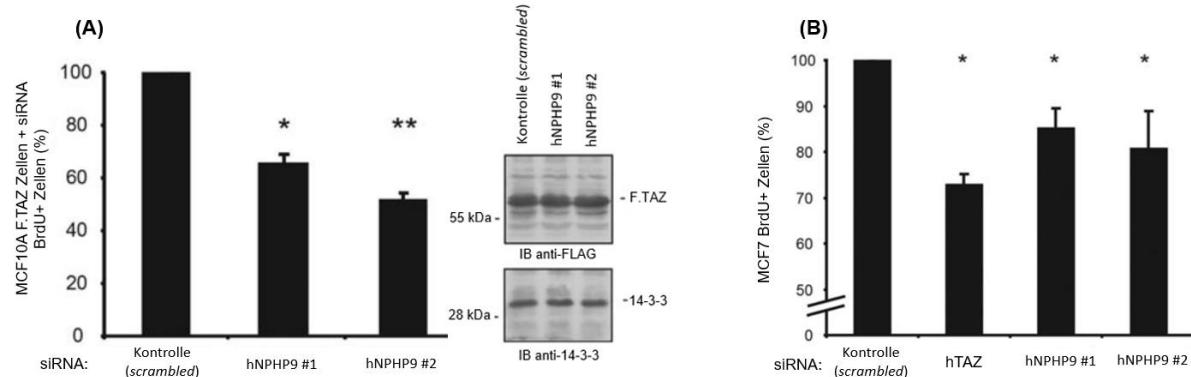


Abbildung 6 Der Knockdown von NPHP9 und TAZ führt zu verminderter Proliferation

(A) Knockdown von NPHP9 in TAZ-exprimierenden MCF10A Zellen. Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der BrdU-positiven Zellen im Vergleich zur Kontroll-siRNA hin. (n = 3; * P < 0,05, **, P < 0,01 im Vergleich zur Negativkontrolle; Fehlerbalken repräsentieren das Standardfehlermittel; die Proliferationsrate der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde auf 100% normiert). Ein Aliquot der Zellprobe wurde für die Western-Blot-Analyse lysiert, die eine konsistente Proteinexpression ergab. (B) Knockdown von TAZ und NPHP9 in MCF7 Zellen. Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der BrdU-positiven Zellen in allen drei untersuchten Proben im Vergleich zur Kontroll-siRNA. (n = 3; *, P < 0,05 im Vergleich zur Negativkontrolle; die Fehlerbalken repräsentieren das Standardfehlermittel; die Proliferationsrate der mit scrambled Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurde als 100% definiert).

5. DISKUSSION

Die antiken Griechen scheinen bereits die beeindruckende Fähigkeit der Leber zur Selbstheilung erkannt zu haben, wie durch das Sagen-Epos von Prometheus und seinem täglich wiederkehrenden Leid verdeutlicht wird: Ein Adler fraß jeden Tag seine Leber, die dann in der Nacht nachwuchs. In der modernen Wissenschaft hat sich gezeigt, dass die Leber von Ratten innerhalb von ungefähr 14 Tagen nach einer Entfernung von zwei Dritteln wieder auf ihre ursprüngliche Größe anwächst. Diese einzigartige Regenerationsfähigkeit legt nahe, dass die Leber und vielleicht auch andere Organe Informationen über ihre ursprüngliche Größe speichern können. Dies wird dadurch ersichtlich, dass das Organwachstum gestoppt wird, sobald die ursprüngliche Größe wiederhergestellt ist. In diesem Zusammenhang könnte der Hippo-Signalweg eine Schlüsselrolle spielen, indem er ein Stoppsignal für das Zellwachstum gibt³⁰.

Ausgangspunkt dieser wissenschaftlichen Arbeit war der Befund, dass NPHP4 und NPHP9, als potente Inhibitoren des Hippo-Signalwegs in Säugetieren agieren^{107,108,107}. Hier wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild der Nephronophthise und dem Hippo-Signalweg hergestellt¹⁰⁷. Angesichts der unterschiedlichen Krankheitsbilder einer Nephronophthise und der ADPKD könnte der Hippo-Signalweg als Regulator von Proliferation und Organgröße eine Schlüsselrolle bei diesen Erkrankungen spielen. Wie genau NPHP4 und NPHP9 bei der Regulation des Hippo-Signalwegs miteinander interagieren, war bislang unklar und wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt. Unsere Befunde legen nahe, dass NPHP4 upstream von NPHP9 agiert und die Lokalisation von NPHP9 reguliert und dass NPHP9 wiederum direkten Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von TAZ nimmt. Dies haben wir detailliert in zwei Studien zusammengefasst¹⁰⁷. Dies wirft die Frage auf, wie genau der Hippo-Signalweg bei der Entstehung unterschiedlicher zystischer Nierenerkrankungen involviert sein könnte, konkret bei der NPHP und bei der ADPKD, die sich phänotypisch hinsichtlich der Nierenerkrankung deutlich unterscheiden.

5.1. Eine mögliche Rolle der Hippokaskade bei der NPH

Bei Aktivierung der Hippo-Signalgebung phosphoryliert die MST-Kinase mit verschiedenen Koaktivatoren, darunter SAV1, die Kinase LATS³⁰. Im Rahmen einer klassischen Signalkaskade phosphoryliert LATS die zentralen Effektorproteine YAP/TAZ, was deren Bindung an zytoplasmatischen 14-3-3 und deren Abbau bewirkt. NPHP4 ist dabei ein Gegenspieler zu dem klassischen Hippo-Effekt, indem es die Wechselwirkung der zentralen Kinase LATS mit TAZ/YAP inhibiert und die Translokation von TAZ/YAP in den Zellkern begünstigt, was zu einer TAZ/YAP/TEAD induzierten Proliferation durch Transkription

spezifischer Zielgene wie *CTGF* oder *c-myc* führt¹⁰⁷. Umgekehrt kann der Funktionsverlust von *NPHP4* zu einer reduzierten TAZ-Aktivierung mit folgender reduzierter Zellproliferation und Regeneration führen¹⁰⁷.

Es ist dabei essentiell zu verstehen, dass die Entstehung und Funktion von Zilien eng mit den Vorgängen des Zellzyklus verwoben sind. Der Ursprung von Zilien ist der Basalkörper, der als spezialisierte Form eines Zentriols fungiert³⁰. Im Zellzyklus, speziell in der Ruhephase G0, bilden sich Zilien. Bevor eine Zelle jedoch wieder in den Zellzyklus eintreten kann, muss die Zilienstruktur abgebaut werden, um das Zentriol freizusetzen. Dieses dient nach seiner Verdopplung als Organisationselement für Mikrotubuli am Spindelpol während der Mitose. Diese spezifische Rolle der Zilien im Zellzyklus hat zur Folge, dass Veränderungen in der Zellproliferation üblicherweise die Anzahl der zilierten Zellen beeinflussen. Ebenso könnte eine Beeinträchtigung der Zilienbildung direkte Auswirkungen auf das Zellwachstum haben³⁰. Somit ist die Frage, in wie weit Zilien Hippo regulieren oder umgekehrt Hippo Einfluss auf Zilien nimmt nicht ganz einfach zu beantworten. Eine Aktivierung von Hippo hat eine Inhibition von Proliferation zu Folge und wird somit die Zahl zilientragender Zellen erhöhen. Eine Aktivierung von TAZ oder YAP wird sich umgekehrt eher negativ auf die Anwesenheit von Zilien auswirken. Gleichzeitig führt aber auch ein Verlust von Zilien zu einer höheren Rate an proliferierenden Zellen, während sich Zellen mit Zilien in der Regel nicht teilen, ohne zuvor das Zilium zu resorbieren. Es ist somit nicht ganz einfach ziliäre Effekt von den Folgen von geändertem Hippo Signaling zu unterscheiden.

Es ist bemerkenswert, dass die Mehrzahl der für Nephronopathie relevanten Proteine an der Basis der primären Zilien lokalisiert sind. Trotz einer gut ausgebauten genetischen Grundlagenforschung, die NPH als eine Ziliopathie klassifiziert hat, bleibt das genaue Funktionsprofil dieser Proteine noch weitestgehend unerforscht. Das Protein NEK8 wurde als ziliäres Protein beschrieben⁷⁵ und das entsprechende Gen, *NPHP9*, ist ebenfalls im Zusammenhang mit zystischen Nierenerkrankungen in jck-Mäusen beschrieben⁷⁹. Darüber hinaus wurde aber NEK8 auch im Zellkern beschrieben⁷⁷ und eine vermehrte Expression von *NPHP9* in Brustkrebszellen festgestellt⁸². Diese Ergebnisse haben uns dazu veranlasst, die Rolle von *NPHP9* im Hippo-Signalweg genauer zu erforschen: Zu Beginn untersuchen wir die Hypothese, dass *NPHP4* mit anderen Nephrozystinen Bindungen eingehen kann. Wie in Abbildung 1 gezeigt, bestätigte ein Koimmunpräzipitationsexperiment die Assoziation zwischen *NPHP4* und *NPHP9*. *NPHP9* bildet gemeinsam mit Inversin, *NPHP3* und *ANKS6* einen Proteinkomplex. Durch *Knockdown*-Experimente in Zebrafisch- und *Xenopus*-Modellen wurde deutlich, dass Störungen in diesem Komplex eine Vielzahl schwerer Fehlbildungen auslösen können, einschließlich kardiovaskulärer Anomalien, Leberfibrose und *Situs inversus*. Dieser Komplex spielt zudem eine entscheidende Rolle bei der korrekten Entwicklung der Nieren¹⁰⁹.

Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner von NEK8 ist PC2: Die Wechselwirkung zwischen NEK8 und PC2 bleibt durch die jck-Mutation unverändert, während es keine Interaktion mit PC-1 gibt¹¹⁰. Diese Mutation führt zu einer erhöhten Expression sowie zu atypischen Phosphorylierungsmustern von PC1 und PC2. Diese Veränderungen stehen in Verbindung mit verlängerten Zilien und einer abweichenden Konzentration dieser Proteine innerhalb der Zilien¹¹⁰. Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine gestörte Funktion von NEK8 möglicherweise die Entstehung von Nierenzysten begünstigen könnte, indem sie die ziliäre Struktur und Aktivität im distalen Nephron beeinflusst¹¹⁰.

Als nächstes befassten wir uns mit der funktionalen Relevanz der NPHP4 – NPHP9 Achse. Während NPHP4 keine nukleäre Lokalisierung aufweist, ist aus vorherigen Studien bekannt, dass NPHP9 auch im Zellkern lokalisiert ist⁷⁷. Frühere Arbeiten zeigten, dass NPHP4 die Fähigkeit besitzt, mit der Serin-Threonin-Kinase LATS zu interagieren. Diese Wechselwirkung hemmt die Phosphorylierung von TAZ an der 14-3-3-Bindungsstelle und erhöht somit die Transkriptionsaktivität von TAZ¹⁰⁸. Unsere Experimente zeigten, dass NPHP4 eine signifikante Rolle bei der Verlagerung von NPHP9 in den Zellkern spielt, ohne dabei die Gesamtkonzentration von NPHP9 zu beeinflussen (siehe Abbildung 2). In diesem Zusammenhang beeinflusst NPHP4 nicht nur positiv die nukleare Anreicherung von TAZ¹⁰⁷, sondern unterstützt auch die effiziente Verlagerung von NPHP9 in den Zellkern. Dies bestätigt unsere ursprüngliche Hypothese. Kopräzipitationsexperimente mit TAZ und NPHP9, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von NPHP4, zeigten, dass die simultane Expression von NPHP4 zu einer deutlichen Zunahme der mit NPHP9 präzipitierten TAZ-Menge führt¹⁰⁸. Unsere Schlussfolgerung, dass NPHP4 durch die Hemmung der TAZ-Phosphorylierung an der 14-3-3-Bindungsstelle zur gemeinsamen nuklearen Anreicherung von TAZ und NPHP9 beiträgt, wurde durch eine Zellfraktionierung bestätigt (siehe dazu Abbildung 3).

Der Transkriptions-Koaktivator TAZ entfaltet den Hauptteil seiner Aktivität in Zusammenarbeit mit Transkriptionsfaktoren der TEAD-Familie¹⁰⁸. Die Aktivität von TAZ wird durch die aktive Hippo-Signalkaskade gehemmt. Unsere Arbeitsgruppe konnte belegen, dass NPHP9 die Aktivität des Hippo-Signalwegs und seines stromabwärts gelegenen Effektors TAZ beeinflusst. In TEAD-Reporterassays, die von einer Kollegin durchgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dass die Expression von TAZ zu einer signifikanten Steigerung der TEAD-Aktivität führt, die in Anwesenheit von NPHP9 verstärkt wird¹⁰⁸. Interessanterweise zeigte eine Kinase-inaktive Mutante, die durch eine Punktmutation in der ATP-Bindungstasche (K33M) gekennzeichnet ist, eine ähnliche Steigerung der TAZ-Aktivität wie der Wildtyp-Phänotyp¹⁰⁸. Dies legt nahe, dass der Einfluss von NPHP9 auf die TAZ/TEAD-Aktivität unabhängig von seiner Kinasedomäne ist. Zur Untermauerung unserer bisherigen Ergebnisse konnten wir die

Kolokalisation von TAZ und NPHP9 im Zellkern mittels Immunfluoreszenz visuell darstellen (siehe dazu Abbildung 4).

NPHP9 wurde mit dem Krankheitsbild der Nephronophthise in Verbindung gebracht, wobei drei bekannte humane pathogenetische Mutationen (L330F, H425Y und A497P) einen NPH-Phänotyp induzieren⁷⁵. Alle drei Mutationen befinden sich in der RCC1-Domäne und beeinflussen nicht die Kinase-Aktivität⁷⁵. Alle Mutationen verursachen in unterschiedlichem Ausmaß Defekte in der ziliären Lokalisierung von NPHP9. Andererseits hat die Überexpression dieser Mutanten keinen Einfluss auf die allgemeine Ziliogenese, Mitose oder Zentriolenanzahl⁷⁵. Eine durch Morpholino induzierte Hemmung von nek8 in Zebrafischen führt zur Bildung von pronephrischen Zysten, während eine Überexpression des menschlichen NEK8 zu Anomalien im Pronephros führt¹¹¹. Ein weiteres Experiment aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die NPHP9-abhängige TAZ-Aktivierung durch diese drei humanen Mutationen nicht vorhanden ist¹⁰⁸. In diesem Kontext kann NPHP9 als ein Treiber von Proliferation und Antiapoptose betrachtet werden. Im Gegensatz dazu können die drei oben erwähnten Patient:innen-Mutationen diese Gene im Zellkern nicht in gleichem Maße aktivieren, was auf eine Beeinträchtigung der Hippo-Signalgebung hinweist und erneut die entscheidende Rolle dieser Signalwege bei embryonalen Wachstumsprozessen unterstreicht¹⁰⁸.

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass eine unzureichende Inhibierung des Hippo-Signalwegs und die sich daraus ergebende mangelnde Aktivierung sowie nukleare Stabilisierung von TAZ potentiell Schlüsselfaktoren im Pathomechanismus der NPH sein könnten³⁰. Da NPH-Patient:innen, die mit intakten Nieren zur Welt kommen, keine schwerwiegenden Defizite in der Zellproliferation zeigen, könnte ein minimaler Abfall der Proliferationsrate oder eine suboptimale Gewebsantwort eine leichte Einschränkung der Geweberegeneration bewirken und eine zentrale Funktion im Krankheitsgeschehen der NPH einnehmen³⁰. Eine verminderte TAZ-abhängige Proliferation könnte dazu beitragen, dass eine Reparatur von Tubulusschäden länger dauert und somit weniger effizient ist. So könnte es während des Fortschreitens der NPH zu einer Akkumulation von Schädigungen kommen. Die Möglichkeit, YAP und TAZ als therapeutische Ansätze zur Behandlung des Nierenphänotyps bei NPH zu nutzen, bedarf weiterer sorgfältiger Prüfung und ist im Moment noch unklar³⁰. Die onkogenen Eigenschaften von YAP und TAZ (siehe nächster Abschnitt) lassen jedoch eine Strategie, die auf ihre Aktivierung zielt, als eher wenig vielversprechend erscheinen. Daher wäre es wichtig, die transkriptionellen Netzwerke besser zu verstehen, die durch YAP und TAZ in den Nieren reguliert werden, um dort vielleicht weniger riskante Anknüpfungspunkte zu identifizieren. Das gleiche gilt auch für die Mechanismen, die auf der Ebene der NPHP

Proteine, also Upstream von YAP und TAZ und eventuell nierenspezifisch deren Aktivität modulieren.

5.2. Hippo bei der ADPKD und bei Tumorerkrankungen

Anders als bei der Nephronophthise steht bei der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung ein erhöhtes Proliferationsverhalten im Fokus³⁰. Auf molekularer Ebene wurde festgestellt, dass TAZ, ein transkriptioneller Koaktivator, am proteasomalen Abbau von PC2 teilnimmt^{105,112}. Der Hippo-Signalweg, der normalerweise das Organwachstum negativ reguliert, würde bei verminderter Aktivität keine zytosolische Festsetzung von YAP/TAZ bewirken³⁰. Die Konsequenz wäre eine erhöhte Verlagerung dieser Proteine in den Zellkern und eine gesteigerte Aktivierung von Genen, die die Zellteilung fördern, was typisch für ADPKD ist³⁰. In Mausversuchen wurde nachgewiesen, dass YAP in die Zellkerne von tubulären Epithelzellen in beiden herkömmlichen und induzierbaren Pkd1-Knockout-Mäusen, sowie in menschlichem Zystenepithel bei ADPKD verlagert wird^{113,30}. Diese Verlagerung führte zu einer verstärkten Aktivierung dreier von vier YAP-abhängigen Genen. Obwohl YAP und TAZ strukturell ähnlich sind, ist die Aktivierung von TAZ überwiegend in fortgeschrittenen Zystenstadien zu beobachten, was für die Krankheitsprogression eher als für die Zystenbildung relevant ist¹¹³. Das Fehlen von Sav1, einem entscheidenden Koaktivator für die zytoplasmatische Bindung von YAP/TAZ, resultiert in übermäßiger Zellteilung der Nierenepithelien sowie in zystischen Veränderungen sowohl in den Nierentubuli als auch in den Glomeruli^{106,114}.

TAZ wurde bereits in mehreren Studien als Onkogen identifiziert^{94,115}. Koexpression von TAZ und myr-AKT in der Mausleber führte zu einer drastischen Zunahme der Entstehung von intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen¹¹⁵. Bemerkenswert ist eine 100%ige Inzidenz und eine hohe Tumorlast bereits nach 10 Wochen. Auf molekularer Ebene war die Entwicklung dieser Läsionen von der Bindung zwischen TAZ und den TEAD-Transkriptionsfaktoren abhängig¹¹⁵. Wenn der Hippo-Signalweg herunterreguliert wird, wie es oft bei Brustkrebs der Fall ist, wird die YAP/TAZ-Aktivität induziert¹¹⁶. Die Rolle von TAZ wurde bei triple-negativem Brustkrebs untersucht und hier zeigt sich auch, dass TAZ auf nichtzellautonome Weise das Tumor-Immunkontrollumfeld modifiziert und die antitumorale Immunantwort dämpft, wodurch das Tumorwachstum erleichtert wird¹¹⁶. Um die Rolle von TAZ im Kontext der Proliferation zu untersuchen, wurde mittels lentiviralem Gentransfer eine stabil TAZ-exprimierende Zelllinie generiert. Wie in Abbildung 5 dargestellt, zeigte sich ein stärkeres proliferatives Signal im Vergleich zur Kontrolle. Dies bestätigt, dass TAZ als Treiber der Zellproliferation agiert.

Wir vermuten, dass die NPHP4/NPHP9-Signalachse eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum und Proliferation in Tumorzellen spielt und möglicherweise ein potentielles therapeutisches Ziel in verschiedenen Tumorarten mit hoher TAZ- und YAP-Aktivität darstellen könnte. NPHP4 wurde erst vor einigen Jahren mit Tumoren in Verbindung gebracht und 2022 konnte in einem *Case Report* ein Fusionsgen Acyl-CoA Thioesterase 7 mit NPHP4 bei einem Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie gefunden werden¹¹⁷. Auffällig war bei diesem Patienten eine Doxorubicin-Resistenz¹¹⁷. Im Gegensatz dazu wurde NPHP9 schon lange mit verschiedenen Karzinomen in Verbindung gebracht, so zum Beispiel beim Mammakarzinom, wo es sich als Überexpression zeigte⁸².

Um das Verständnis der Funktion von NPHP9 zu vertiefen, haben wir Interferenz-RNAs (*short interfering RNA, siRNA*) generiert und die Effektivität der Unterdrückung mittels qPCR verifiziert (siehe Abbildung 5). Das *in vitro* durchgeführte Experiment liefert signifikante Beweise für die prinzipielle Machbarkeit, die NPHP9-mRNA-Expression durch den Einsatz von *siRNA* gezielt negativ zu regulieren. Diese Untersuchung stellt somit einen Baustein dar, der das Potenzial einer *siRNA*-vermittelten Reduktion der *NPHP9*-Genexpression aufzeigt und als Grundlage für weiterführende Studien dienen kann. Da NPHP9 und TAZ bereits als Treiber der Proliferation beschrieben worden sind, wollen wir in Abbildung 6 zeigen, dass TAZ-überexprimierenden Zellen nach NPHP9-Suppression eine verminderte Proliferation mittels BrdU-Messung in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann. Somit könnte eine NPHP9-Inhibition die TAZ-induzierte Hyperproliferation teilweise umkehren und als potenzielle Angriffsstelle für zukünftige Tumortherapien dienen. Eine Überexpression von TAZ wurde in den meisten Brustkrebszelllinien und mehreren invasiven Mammakarzinomen gefunden. Der antiproliferative Effekt der negativen NPHP9-Regulation konnte auch in Brustkrebszelllinien, wie in Abbildung 6 gezeigt, nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass NPHP9 die Phosphorylierung von TAZ beeinflusst und die Überexpression von NPHP9 in Brustkrebs zu einer Aktivierung von TAZ führen könnte, ohne die Gesamtexpressionslevel von TAZ zu beeinflussen.

In der vorliegenden Dissertation werden einige Limitationen deutlich. Insbesondere ist zu erwähnen, dass sämtliche Experimente ausschließlich in Zellkulturen durchgeführt wurden. Dies impliziert, dass die Ergebnisse hinsichtlich Wachstums und Proliferation lediglich auf bereits immortalisierten Zellen basieren und somit in ihrer Aussagekraft eingeschränkt sind. Nichtsdestotrotz liefern die erzielten Erkenntnisse wertvolle Ansätze, die in zukünftigen Forschungen an lebenden Organismen weiterverfolgt werden sollten.

Weitere Untersuchungen sind unerlässlich, um das Spektrum von NPHP9 in der Pathogenese der NPH, der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung und in malignen

Zelltypen umfassend zu charakterisieren. Dies ist insbesondere vor dem wissenschaftlichen Hintergrund relevant, dass kürzlich NEK8 mit der ADPKD in Verbindung gebracht wurde und eine autosomal-dominante Form der NPH diskutiert wird. Des Weiteren eröffnet NPHP9, wie in der vorliegenden Studie dargelegt, als potentielles therapeutisches Ziel die Perspektive für antiproliferative Ansätze. Daher bedarf es fortgesetzter wissenschaftlicher Anstrengungen, um die Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze bei spezifischen Tumorformen zu ermöglichen⁸².

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Hildebrandt F, Otto E. Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nat Rev Genet* 2005; **6**(12): 928-40.
2. Hildebrandt F, Attanasio M, Otto E. Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**(1): 23-35.
3. Gupta S, Ozimek-Kulik JE, Phillips JK. Nephronophthisis-Pathobiology and Molecular Pathogenesis of a Rare Kidney Genetic Disease. *Genes (Basel)* 2021; **12**(11).
4. Simms RJ, Hynes AM, Eley L, Sayer JA. Nephronophthisis: a genetically diverse ciliopathy. *Int J Nephrol* 2011; **2011**: 527137.
5. Luo F, Tao YH. Nephronophthisis: A review of genotype-phenotype correlation. *Nephrology (Carlton)* 2018; **23**(10): 904-11.
6. Gagnadoux MF, Bacri JL, Broyer M, Habib R. Infantile chronic tubulo-interstitial nephritis with cortical microcysts: variant of nephronophthisis or new disease entity? *Pediatr Nephrol* 1989; **3**(1): 50-5.
7. Olbrich H, Fliegauf M, Hoefele J, et al. Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet* 2003; **34**(4): 455-9.
8. Hildebrandt F, Strahm B, Nothwang HG, et al. Molecular genetic identification of families with juvenile nephronophthisis type 1: rate of progression to renal failure. APN Study Group. Arbeitsgemeinschaft für Padiatrische Nephrologie. *Kidney Int* 1997; **51**(1): 261-9.
9. Fanconi G, Hanhart E, von AA, Uhlinger E, Dolivo G, Prader A. [Familial, juvenile nephronophthisis (idiopathic parenchymal contracted kidney)]. *Helv Paediatr Acta* 1951; **6**(1): 1-49.
10. Stokman M, Lilien M, Knoers N. Nephronophthisis-Related Ciliopathies. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA); 1993.
11. Yahalom C, Volovelsky O, Macarov M, et al. SENIOR-LOKEN SYNDROME: A Case Series and Review of the Renoretinal Phenotype and Advances of Molecular Diagnosis. *Retina* 2021; **41**(10): 2179-87.
12. Turkyilmaz A, Geckinli BB, Alavanda C, et al. Meckel-Gruber Syndrome: Clinical and Molecular Genetic Profiles in Two Fetuses and Review of the Current Literature. *Genet Test Mol Biomarkers* 2021; **25**(6): 445-51.
13. Gana S, Serpieri V, Valente EM. Genotype-phenotype correlates in Joubert syndrome: A review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2022; **190**(1): 72-88.
14. Lin AE, Traum AZ, Sahai I, et al. Sensenbrenner syndrome (Cranioectodermal dysplasia): clinical and molecular analyses of 39 patients including two new patients. *Am J Med Genet A* 2013; **161A**(11): 2762-76.
15. Forsythe E, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 2013; **21**(1): 8-13.
16. Braun DA, Hildebrandt F. Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; **9**(3).
17. Salomon R, Saunier S, Niaudet P. Nephronophthisis. *Pediatr Nephrol* 2009; **24**(12): 2333-44.
18. Srivastava S, Sayer JA. Nephronophthisis. *J Pediatr Genet* 2014; **3**(2): 103-14.
19. Wolf MT, Hildebrandt F. Nephronophthisis. *Pediatr Nephrol* 2011; **26**(2): 181-94.
20. Williams CL, Li C, Kida K, et al. MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J Cell Biol* 2011; **192**(6): 1023-41.
21. Sang L, Miller JJ, Corbit KC, et al. Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* 2011; **145**(4): 513-28.
22. Wolf MT. Nephronophthisis and related syndromes. *Curr Opin Pediatr* 2015; **27**(2): 201-11.
23. McConnachie DJ, Stow JL, Mallett AJ. Ciliopathies and the Kidney: A Review. *Am J Kidney Dis* 2021; **77**(3): 410-9.
24. Capuano I, Buonanno P, Riccio E, Amicone M, Pisani A. Therapeutic advances in ADPKD: the future awaits. *J Nephrol* 2022; **35**(2): 397-415.
25. Lanktree MB, Haghghi A, Guiard E, et al. Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *J Am Soc Nephrol* 2018; **29**(10): 2593-600.

26. Corne Le Gall E, Alam A, Perrone RD. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2019; **393**(10174): 919-35.
27. Neumann HP, Jilg C, Bacher J, et al. Epidemiology of autosomal-dominant polycystic kidney disease: an in-depth clinical study for south-western Germany. *Nephrol Dial Transplant* 2013; **28**(6): 1472-87.
28. Wakai K, Nakai S, Kikuchi K, et al. Trends in incidence of end-stage renal disease in Japan, 1983-2000: age-adjusted and age-specific rates by gender and cause. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**(8): 2044-52.
29. Stengel B, Billon S, Van Dijk PC, et al. Trends in the incidence of renal replacement therapy for end-stage renal disease in Europe, 1990-1999. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**(9): 1824-33.
30. Muller RU, Schermer B. Hippo signaling-a central player in cystic kidney disease? *Pediatr Nephrol* 2020; **35**(7): 1143-52.
31. Corne Le Gall E, Torres VE, Harris PC. Genetic Complexity of Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Diseases. *J Am Soc Nephrol* 2018; **29**(1): 13-23.
32. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 1994; **77**(6): 881-94.
33. Hughes J, Ward CJ, Peral B, et al. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995; **10**(2): 151-60.
34. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996; **272**(5266): 1339-42.
35. Lemos FO, Ehrlich BE. Polycystin and calcium signaling in cell death and survival. *Cell Calcium* 2018; **69**: 37-45.
36. Gargalionis AN, Basdra EK, Papavassiliou AG. Polycystins in disease mechanobiology. *J Cell Biochem* 2019; **120**(5): 6894-8.
37. Hopp K, Ward CJ, Hommerding CJ, et al. Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J Clin Invest* 2012; **122**(11): 4257-73.
38. Lantinga-van Leeuwen IS, Dauwerse JG, Baelde HJ, et al. Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2004; **13**(24): 3069-77.
39. Gainullin VG, Hopp K, Ward CJ, Hommerding CJ, Harris PC. Polycystin-1 maturation requires polycystin-2 in a dose-dependent manner. *J Clin Invest* 2015; **125**(2): 607-20.
40. Cai Y, Fedele SV, Dong K, et al. Altered trafficking and stability of polycystins underlie polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 2014; **124**(12): 5129-44.
41. Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, Horie S, Peters DJM, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018; **4**(1): 50.
42. Chebib FT, Torres VE. Recent Advances in the Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; **13**(11): 1765-76.
43. Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med* 2011; **364**(16): 1533-43.
44. Singla V, Reiter JF. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 2006; **313**(5787): 629-33.
45. Wheatley DN, Wang AM, Strugnell GE. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int* 1996; **20**(1): 73-81.
46. Chen HY, Kelley RA, Li T, Swaroop A. Primary cilia biogenesis and associated retinal ciliopathies. *Semin Cell Dev Biol* 2021; **110**: 70-88.
47. Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**(11): 813-25.
48. Nachury MV. How do cilia organize signalling cascades? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; **369**(1650).
49. Ishikawa H, Thompson J, Yates JR, 3rd, Marshall WF. Proteomic analysis of mammalian primary cilia. *Curr Biol* 2012; **22**(5): 414-9.
50. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; **12**(4): 222-34.
51. Ye F, Nager AR, Nachury MV. BBSome trains remove activated GPCRs from cilia by enabling passage through the transition zone. *J Cell Biol* 2018; **217**(5): 1847-68.

52. Shiba D, Yamaoka Y, Hagiwara H, Takamatsu T, Hamada H, Yokoyama T. Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region. *J Cell Sci* 2009; **122**(Pt 1): 44-54.
53. Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, et al. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet* 2011; **43**(8): 776-84.
54. Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**(12): 5519-23.
55. Pooranachandran N, Malicki JJ. Unexpected Roles for Ciliary Kinesins and Intraflagellar Transport Proteins. *Genetics* 2016; **203**(2): 771-85.
56. Scholey JM. Kinesin-2: a family of heterotrimeric and homodimeric motors with diverse intracellular transport functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013; **29**: 443-69.
57. Pazour GJ, Dickert BL, Witman GB. The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol* 1999; **144**(3): 473-81.
58. Moyer JH, Lee-Tischler MJ, Kwon HY, et al. Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 1994; **264**(5163): 1329-33.
59. Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, et al. Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 2000; **151**(3): 709-18.
60. Pazour GJ, Witman GB. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**(1): 105-10.
61. Evans JE, Snow JJ, Gunnarson AL, et al. Functional modulation of IFT kinesins extends the sensory repertoire of ciliated neurons in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2006; **172**(5): 663-9.
62. Malicki JJ, Johnson CA. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol* 2017; **27**(2): 126-40.
63. Goto H, Inaba H, Inagaki M. Mechanisms of ciliogenesis suppression in dividing cells. *Cell Mol Life Sci* 2017; **74**(5): 881-90.
64. Hamze-Komaiba O, Sarr S, Arlot-Bonnemains Y, Samuel D, Gassama-Diagne A. SHIP2 Regulates Lumen Generation, Cell Division, and Ciliogenesis through the Control of Basolateral to Apical Lumen Localization of Aurora A and HEF 1. *Cell Rep* 2016; **17**(10): 2738-52.
65. Nishimura Y, Yamakawa D, Shiromizu T, Inagaki M. Aurora A and AKT Kinase Signaling Associated with Primary Cilia. *Cells* 2021; **10**(12).
66. Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; **15**(4): 199-219.
67. Pazour GJ, Rosenbaum JL. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol* 2002; **12**(12): 551-5.
68. Mollet G, Salomon R, Gribouval O, et al. The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat Genet* 2002; **32**(2): 300-5.
69. Schuermann MJ, Otto E, Becker A, et al. Mapping of gene loci for nephronophthisis type 4 and Senior-Loken syndrome, to chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 2002; **70**(5): 1240-6.
70. Bakkaloglu SA, Kandur Y, Bedir-Demirdag T, Isik-Gonul I, Hildebrandt F. Diverse phenotypic expression of NPHP4 mutations in four siblings. *Turk J Pediatr* 2014; **56**(4): 423-6.
71. Liebau MC, Hopker K, Muller RU, et al. Nephrocystin-4 regulates Pyk2-induced tyrosine phosphorylation of nephrocystin-1 to control targeting to monocilia. *J Biol Chem* 2011; **286**(16): 14237-45.
72. Jauregui AR, Nguyen KC, Hall DH, Barr MM. The *Caenorhabditis elegans* nephrocystins act as global modifiers of cilium structure. *J Cell Biol* 2008; **180**(5): 973-88.
73. Borgal L, Habbig S, Hatzold J, et al. The ciliary protein nephrocystin-4 translocates the canonical Wnt regulator Jade-1 to the nucleus to negatively regulate beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 2012; **287**(30): 25370-80.

74. Rajagopalan R, Gochowski CM, Gilbert MA, et al. Compound heterozygous mutations in NEK8 in siblings with end-stage renal disease with hepatic and cardiac anomalies. *Am J Med Genet A* 2016; **170**(3): 750-3.
75. Otto EA, Trapp ML, Schultheiss UT, Helou J, Quarmby LM, Hildebrandt F. NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**(3): 587-92.
76. Shiba D, Manning DK, Koga H, Beier DR, Yokoyama T. Inv acts as a molecular anchor for Nphp3 and Nek8 in the proximal segment of primary cilia. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; **67**(2): 112-9.
77. Zalli D, Bayliss R, Fry AM. The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthisis, is both activated and degraded during ciliogenesis. *Hum Mol Genet* 2012; **21**(5): 1155-71.
78. Czarnecki PG, Gabriel GC, Manning DK, et al. ANKS6 is the critical activator of NEK8 kinase in embryonic situs determination and organ patterning. *Nat Commun* 2015; **6**: 6023.
79. Liu S, Lu W, Obara T, et al. A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development* 2002; **129**(24): 5839-46.
80. Manning DK, Sergeev M, van Heesbeen RG, et al. Loss of the ciliary kinase Nek8 causes left-right asymmetry defects. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**(1): 100-12.
81. Valkova N, Yunis R, Mak SK, Kang K, Kultz D. Nek8 mutation causes overexpression of galectin-1, sorcin, and vimentin and accumulation of the major urinary protein in renal cysts of jck mice. *Mol Cell Proteomics* 2005; **4**(7): 1009-18.
82. Bowers AJ, Boylan JF. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene* 2004; **328**: 135-42.
83. Cao B, Zhang K, Pan C, Dong Y, Lu F. NEK8 regulates colorectal cancer progression via phosphorylating MYC. *Cell Commun Signal* 2023; **21**(1): 209.
84. Claus LR, Chen C, Stallworth J, et al. Certain heterozygous variants in the kinase domain of the serine/threonine kinase NEK8 can cause an autosomal dominant form of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2023; **104**(5): 995-1007.
85. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev* 1995; **9**(5): 534-46.
86. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. *Development* 1995; **121**(4): 1053-63.
87. Tapon N, Harvey KF, Bell DW, et al. salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 2002; **110**(4): 467-78.
88. Harvey KF, Pfleger CM, Hariharan IK. The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 2003; **114**(4): 457-67.
89. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003; **114**(4): 445-56.
90. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* 2005; **122**(3): 421-34.
91. Dong J, Feldmann G, Huang J, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* 2007; **130**(6): 1120-33.
92. Hansen CG, Moroishi T, Guan KL. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol* 2015; **25**(9): 499-513.
93. Totaro A, Panciera T, Piccolo S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat Cell Biol* 2018; **20**(8): 888-99.
94. Ma S, Meng Z, Chen R, Guan KL. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu Rev Biochem* 2019; **88**: 577-604.
95. Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 2015; **163**(4): 811-28.
96. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* 2016; **29**(6): 783-803.

97. Fernandez LA, Kenney AM. The Hippo in the room: a new look at a key pathway in cell growth and transformation. *Cell Cycle* 2010; **9**(12): 2292-9.
98. Fernandez LA, Northcott PA, Dalton J, et al. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes Dev* 2009; **23**(23): 2729-41.
99. Hall CA, Wang R, Miao J, et al. Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene. *Cancer Res* 2010; **70**(21): 8517-25.
100. Zhang X, George J, Deb S, et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene. *Oncogene* 2011; **30**(25): 2810-22.
101. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 2010; **19**(4): 491-505.
102. Safari S, Movafagh A, Zare-Adollahi D, et al. MST1/2 and YAP1 gene expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; **55**(9): 2189-91.
103. Morinaga N, Shitara Y, Yanagita Y, et al. Molecular analysis of the h-warts/LATS1 gene in human breast cancer. *Int J Oncol* 2000; **17**(6): 1125-9.
104. Hisaoka M, Tanaka A, Hashimoto H. Molecular alterations of h-warts/LATS1 tumor suppressor in human soft tissue sarcoma. *Lab Invest* 2002; **82**(10): 1427-35.
105. Tian Y, Kolb R, Hong JH, et al. TAZ promotes PC2 degradation through a SCF β -Trcp E3 ligase complex. *Mol Cell Biol* 2007; **27**(18): 6383-95.
106. Reginensi A, Scott RP, Gregorieff A, et al. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet* 2013; **9**(3): e1003380.
107. Habbig S, Bartram MP, Muller RU, et al. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J Cell Biol* 2011; **193**(4): 633-42.
108. Habbig S, Bartram MP, Sagmuller JG, et al. The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ. *Hum Mol Genet* 2012; **21**(26): 5528-38.
109. Hoff S, Halbritter J, Epting D, et al. ANKS6 is a central component of a nephronophthisis module linking NEK8 to INVS and NPHP3. *Nat Genet* 2013; **45**(8): 951-6.
110. Sohara E, Luo Y, Zhang J, Manning DK, Beier DR, Zhou J. Nek8 regulates the expression and localization of polycystin-1 and polycystin-2. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**(3): 469-76.
111. Fukui H, Shiba D, Asakawa K, Kawakami K, Yokoyama T. The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. *FEBS Lett* 2012; **586**(16): 2273-9.
112. Yim H, Sung CK, You J, Tian Y, Benjamin T. Nek1 and TAZ interact to maintain normal levels of polycystin 2. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**(5): 832-7.
113. Happe H, van der Wal AM, Leonhard WN, et al. Altered Hippo signalling in polycystic kidney disease. *J Pathol* 2011; **224**(1): 133-42.
114. Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, et al. Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J Pathol* 2016; **239**(1): 97-108.
115. Cigliano A, Zhang S, Ribback S, et al. The Hippo pathway effector TAZ induces intrahepatic cholangiocarcinoma in mice and is ubiquitously activated in the human disease. *J Exp Clin Cancer Res* 2022; **41**(1): 192.
116. Gershoni A, Hassin O, Nataraj NB, et al. TAZ facilitates breast tumor growth by promoting an immune-suppressive tumor microenvironment. *Mol Oncol* 2023; **17**(12): 2675-93.
117. Zong X, Kang Z, Huang D, et al. One novel ACOT7-NPHP4 fusion gene identified in one patient with acute lymphoblastic leukemia: a case report. *BMC Med Genomics* 2022; **15**(1): 226.

7. ANHANG

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Koimmunpräzipitation von NPHP9 und NPHP4	41
Abbildung 2 Der Einfluss von NPHP4 auf die Lokalisation von NPHP9 im Zellfraktionierungsassay	42
Abbildung 3 Zellfraktionierung zur Analyse der TAZ Lokalisation in Abhängigkeit von NPHP9	43
Abbildung 4 Immunfluoreszenz Färbung von MCF10A Zellen mit Koexpression von F.TAZ und V5.NPHP9	44
Abbildung 5 Proliferationsanalyse von MCF10A-Zellen mit stabiler TAZ-Überexpression und Validierung der NPHP9 siRNA mittels qPCR in den gleichen Zellen	45
Abbildung 6 Der Knockdown von NPHP9 und TAZ führt zu verminderter Proliferation	46

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Eukaryote Zellen	22
Tabelle 2 Kulturmedien für eukaryote Zellen	22
Tabelle 3 Prokaryote Zellen	22
Tabelle 4 Kulturmedien für prokaryote Zellen	23
Tabelle 5 Ansatz für Restriktionsenzym-Analyse	23
Tabelle 6 Ansatz für die DNA-Ligation	24
Tabelle 7 Plasmidkonstrukte	24
Tabelle 8 siRNA Sequenzen	24
Tabelle 9 Plasmide für lentiviralen Gentransfer	24
Tabelle 10 IP-Puffer Zusammensetzung	25
Tabelle 11 Pufferlösungen für die Zellfraktionierung	25
Tabelle 12 Zusammensetzung des SDS-Gels	25
Tabelle 13 Zusammensetzung der Western Blot Puffer	26
Tabelle 14 Zusammensetzung der Elektrochemilumineszenz Reagenzien	26
Tabelle 15 Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz	26
Tabelle 16 Sekundärantikörper für Western Blot	27
Tabelle 17 Primärantikörper für die Durchflusszytometrie	27
Tabelle 18 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie	27
Tabelle 19 Mastermix für PCR	28
Tabelle 20 Real-Time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) Primer	28
Tabelle 21 PCR Ansatz für die Sequenzierung	28
Tabelle 22 Amplifikationsprotokoll	37

8. VORABVERÖFFENTLICHEN VON ERGEBNISSEN

1. Habbig S, Bartram MP, Müller RU, Schwarz R, Andriopoulos N, Chen S, Sägmüller JG, Hoehne M, Burst V, Liebau MC, Reinhardt HC, Benzing T, Schermer B. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J Cell Biol.* 2011 May 16;193(4):633-42. doi: 10.1083/jcb.201009069. Epub 2011 May 9. PMID: 21555462; PMCID: PMC3166863.
2. Habbig S, Bartram MP, Sägmüller JG, Griessmann A, Franke M, Müller RU, Schwarz R, Hoehne M, Bergmann C, Tessmer C, Reinhardt HC, Burst V, Benzing T, Schermer B. The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ. *Hum Mol Genet.* 2012 Dec 15;21(26):5528-38. doi: 10.1093/hmg/ddz408. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23026745.