

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

Der Proteinkomplex von NPHP15/CEP164 in humanen Nierenzellen

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

vorgelegt von
Lisa Leonora Hartmann
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 28. Februar 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. L. Eichinger

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 Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Dr. Lena Ebert

Herr Prof. Dr. Bernhard Schermer

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 Experimente wurden unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Schermer und Frau Dr. Ebert im nephrologischen Forschungslabor durchgeführt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse der Interaktomanalyse wurden in der Proteomics Facility des CECAD Köln ermittelt.

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.

Köln, den 04.09.2023

Unterschrift:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. Hauer', followed by a long horizontal line extending to the right.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die an dieser Arbeit beteiligt waren, meine Dankbarkeit für Ihre Unterstützung aussprechen.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Schermer für die Betreuung meines Dissertationsprojektes danken. Ich bedanke mich herzlich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation in seinem Labor, welche eine überaus lehrreiche Zeit war.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Lena Ebert, die mich in die Strukturen und Techniken der Laborarbeit eingeführt hat, mir für Fragen zur Seite stand und mich auf dem Weg zu dieser Arbeit stets unterstützt hat.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Nephrolab Kölns für Ihre tatkräftige Unterstützung und Fachexpertise. Insbesondere möchte ich den Medizinisch-technischen Assistentinnen Stefanie Keller, Martyna Brütting sowie Serena Greco-Torres danken, welche mir stets mit Ihrer langjährigen Erfahrung sowie Ihrem Fachwissen bei jedem Problem zur Seite standen und für alle Fragen offen waren.

Auch möchte ich Claudia Dafinger danken, welche mir die Zellen der CCD_RCC-Zellreihe im Nephrolab für Experimente zur Verfügung gestellt hat.

Der Proteomics Facility des CECAD danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Messung und Bereitstellung der Daten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für Ihre Unterstützung, stetige Ermutigung und Hilfe im Prozess zu dieser Arbeit bedanken.

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 ZUSAMMENFASSUNG	10
2 EINLEITUNG	11
2.1 Zystische Nierenerkrankungen	11
2.1.1 ADPKD/ARPKD	11
2.1.2 Nephronophthise	12
2.2 Primäre Zilien in der Pathologie polyzystischer Nierenerkrankungen	13
2.2.1 Funktion und Aufbau des primären Ziliums	13
2.2.2 Der periodische Auf- und Abbau von Zilien	15
2.2.3 Die Rolle von NPHP15 für die Entwicklung der Nephronophthise	16
2.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	19
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Material	20
3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Lösungen	20
3.1.2 Kits und Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3 Plasmide	24
3.1.4 Primer	25
3.1.5 Bakterien	25
3.1.6 Antikörper	26
3.1.7 Enzyme	27
3.1.8 Zellen und Zellmedien	28
3.1.9 Geräte	28
3.1.10 Software	29
3.2 Methoden	30
3.2.1 DNA-Gelelektrophorese	30
3.2.2 Molekulares Klonieren	30
3.2.2.1 Q5 PCR	31
3.2.2.2 Ligation	32
3.2.2.3 Transformation	33
3.2.2.4 Plasmidisolation	33
3.2.2.5 Sanger Sequenzierung	34
3.2.3 Kultivieren und Passagieren von Säugerzellen	35
3.2.4 Einfrieren von Säugerzellen	35
3.2.5 Transiente Transfektion von Säugerzellen	36
3.2.5.1 Calcium-Phosphat-Methode	36
3.2.5.2 Lipofectamin 2000 Reagenz	36
3.2.5.3 GeneJuice	36

3.2.6	Zellen ernten	37
3.2.7	Generierung stabiler TALEN Zelllinien.....	37
3.2.7.1	Integrations PCR für TALEN Zelllinien.....	38
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbung.....	40
3.2.9	Western Blot.....	40
3.2.10	Immunpräzipitation.....	41
3.2.11	Massenspektrometrie.....	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Selektions- und Transfektionseigenschaften einer humanen Zelllinie des distalen Tubulus.....	43
4.2	Genom-Editierung mittels TALENS in CCD_RCC Zellen.....	45
4.3	Etablierung und Charakterisierung der CEP164.3xFlag HEK293T TALEN Zelllinie	46
4.4	Co-Immunpräzipitation von CEP164	48
4.5	Analyse der MS/MS Daten der Co-IP von CEP164	50
5	DISKUSSION.....	56
5.1	Zellen des distalen Tubulussystems eignen sich zur Untersuchung primärer Zilien..	56
5.2	NPHP15 interagiert mit Proteinen des mitochondrialen Stoffwechsels	57
5.3	NPHP15 und Autophagie	58
5.4	Die Rolle von NPHP15 bei DNA Damage Response Vorgängen	59
5.5	Betrachtung des NPHP15-Interaktoms im Hinblick auf Ziliopathien	60
5.6	Hypothesen und Ausblick	62
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	63
7	ANHANG	69
7.1	Abbildungsverzeichnis	69
7.2	Tabellenverzeichnis	70

Abkürzungsverzeichnis

AAVS	Adenoassoziierte Viren
Abb	Abbildung
ADPKD	Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung
ARPKD	Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung
ATG	Autophagie assoziierte Proteine
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CAA	Chloracetamid
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CEP83	Zentrosomales Protein 83
CEP164	Zentrosomales Protein 164
CEP110	Zentrioläres coiled-coil Protein 110
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ECL	Elektrochemoluminiszenz
FBS	Fetal bovines Serum
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HDR	<i>Homology directed repair</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
IMCD	<i>Inner medullar collecting duct</i>
IFT	Intraflagellarer Transport

IFT88	Intraflagellares Transportprotein 88
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
min	Minute
MTP	Mitochondriales trifunktionales Protein
µg	Mikrogramm
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NPH	Nephronophthise
PAA	Polyacrylsäure
PARP	Poly-ADP-ribose-Polymerase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
s	Sekunde
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRPP2	<i>Transient receptor potential polycystin 2</i>
TTBK2	<i>Tau tubulin kinase 2</i>
VHL	von Hippel Lindau
VCP	<i>Valosin containing protein</i>

WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Zystische Nierenerkrankungen gehören zu den Ziliopathien und werden durch Mutationen in Genen ausgelöst, die für ziliäre Proteine kodieren¹. Eine wichtige zystische Nierenerkrankung ist die Nephronophthise (NPH). Es handelt sich dabei um eine schwerwiegende genetische Erkrankung, für die bisher keine kausale Therapie existiert². Es konnten schon eine Vielzahl krankheitsauslösender Mutationen gefunden werden, jedoch sind die grundlegenden pathophysiologischen Vorgänge bislang noch weitgehend unverstanden².

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die humane Zelllinie CCD_RCC des distalen Nierentubulus näher auf ihre Wachstumseigenschaften sowie Transfektionseigenschaften und die Ausbildung von primären Zilien untersucht. Allerdings gelang es nicht, mit Genomeditierung stabile Zelllinien herzustellen. Im Anschluss konnte mit HEK 293T-Zellen eine Zelllinie etabliert werden, die das NPHP-Protein NPHP15 (CEP164), welches am Basalkörper des primären Ziliums lokalisiert ist, gekoppelt an ein Flag-Tag exprimiert. Mit einer Co-Immunpräzipitation wurden die mit NPHP15 interagierenden Proteine aus den Zellen präzipitiert und in einer Massenspektrometrie-Untersuchung das Interaktom von NPHP15 erstellt. Hier zeigten sich insgesamt 31 signifikant angereicherte Proteine, welche teilweise bekannte Funktionen von NPHP15 stützen sowie Vermutungen über neue zelluläre Lokalisationen des Proteins zulassen. Sie weisen etwa auf eine mögliche Beeinflussung mitochondrialer Funktionen durch NPHP15 hin, was schon bei anderen Ziliopathien, wie der ADPKD, eine Rolle spielt. Im letzten Schritt dieser Arbeit wurde der Datensatz mit Proteomdaten anderer zentrosomaler Proteine sowie *proximity labeling* Daten anderer NPH-Proteine verglichen. Durch weitere Daten zu Interaktionsnetzwerken von NPH-Proteinen soll es zukünftig möglich sein, das grundlegende Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der Nephronophthise zu erweitern sowie neue Ansatzpunkte für die Therapie dieser Erkrankung zu finden. Insbesondere für Gentherapie- oder Immuntherapieverfahren könnten die Interaktionsnetzwerke von NPH-Proteinen therapeutische Ansatzpunkte darstellen.

2 Einleitung

2.1 Zystische Nierenerkrankungen

Hereditäre (poly-) zystische Nierenerkrankungen sind eine Gruppe nephrologischer Erkrankungen, deren Hauptmerkmal die progrediente Entstehung von Zysten sowie die Fibrosierung des Parenchyms ist³. Zysten sind flüssigkeitsgefüllte, verkapselte Hohlräume im Parenchym der Niere, die sich durch Proliferation der Tubulusepithelzellen bilden. Dabei wird in das entstehende Lumen Flüssigkeit sekretiert, welche die Ausbildung der Zyste vorantreibt⁴. Einzelne Zysten treten klinisch selten in Erscheinung und stellen keine große gesundheitliche Bedrohung dar. Zystische Nierenerkrankungen führen jedoch zu einer progredienten Funktionseinschränkung der Niere bis hin zum terminalen Nierenversagen⁴. Zum jetzigen Zeitpunkt sind für diese Erkrankungen keine kausalen Therapien bekannt, sodass bei Progredienz Dialyseverfahren oder eine Nierentransplantation notwendig werden⁵. Im Folgenden werden zwei wichtige Erkrankungen eingeführt.

2.1.1 ADPKD/ARPKD

Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist die häufigste genetische Nierenerkrankung und besitzt eine Inzidenz von 1:1000 in Europa⁵. Sie ist gekennzeichnet durch die Entstehung multipler parenchymaler Nierenzysten mit starker Vergrößerung der Nieren, was mit einer sich progredient reduzierenden Nierenfunktion einhergeht⁵. Die Manifestation der Erkrankung zeigt sich klinisch beginnend zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr durch Hämaturie, Flankenschmerzen, Harnwegsinfektionen sowie Hypertonie⁵. Die häufigste extrarenale Manifestation sind Leberzysten³.

Die Pathogenese der ADPKD ist bedingt durch *loss-of-function* Mutationen in Genen, die Membranproteine im Zilium der Nierenepithelzellen exprimieren. Diese Gene sind *PKD1* und *PKD2*, welche die Proteine Polycystin 1 und Polycystin 2 kodieren⁶. Diese beiden Proteine bilden gemeinsam einen Calciumkanal-Rezeptorkomplex⁵. Mutationen von *PKD1* oder *PKD2* sind mit einer verminderten intrazellulären Calciumkonzentration assoziiert und führen damit zu einer erhöhten intrazellulären cAMP-Aktivität. Dies hat die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Folge, resultiert in Hyperproliferation und Hypersekretion und unterstützt die Zystenbildung⁵. Mit der ARPKD existiert eine autosomal-rezessiv vererbte Form der Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:20.000 in der europäischen Bevölkerung⁷. Diese Erkrankung zeigt sich meist früh bei Geburt in Form von Nierenzysten, Leberfibrose und pulmonaler Hypoplasie, was häufig in Nierenversagen und respiratorischen Komplikationen mündet⁷.

2.1.2 Nephronophthise

Als weitere polyzystische Nierenerkrankung ist die Nephronophthise (NPH) zu nennen. Es handelt sich um eine autosomal-rezessive tubulointerstitielle Erkrankung⁸. Die NPH ist mit einer Inzidenz von 1:50.000 die häufigste genetische Ursache eines terminalen Nierenversagens in den ersten 30 Lebensjahren⁸. Die NPH ist durch interstitielle Fibrose, Verdickung der Basalmembran und verstrichenem Übergang zwischen Rinde und Mark gekennzeichnet⁹. Zysten treten hier eher im späteren Verlauf der Erkrankung auf⁹. Die Patienten zeigen eine renale Atrophie aufgrund der progredienten tubulointerstitiellen Fibrose¹⁰. Diese hat zur Folge, dass die Nierentubuli den Urin nicht mehr konzentrieren können, was sich initial durch Polyurie, Polydipsie sowie Nykturie/Enuresis zeigt¹¹. Im fortgeschrittenen Stadium kann sich die Erkrankung durch Anämie, Wachstumsretardierung sowie Hypertonie und metabolischer Azidose manifestieren¹²;¹. Insgesamt präsentiert sich die NPH häufig sehr heterogen und in bis zu 50% der Fälle treten Manifestationen an anderen Organen auf². Diese betreffen vorwiegend Augen, Leber, Pankreas oder ZNS und sind häufig Teil genetisch und phänotypisch überlappender Syndrome, etwa des Joubert-Syndroms, des Bardet-Biedl Syndroms, des Meckel-Gruber Syndroms oder des Senior-Løken-Syndroms². Das Joubert-Syndrom ist durch eine Vermisaplasie des Gehirns gekennzeichnet und führt zu neurologischen Symptomen wie Ataxie und muskulärer Hypotonie⁸. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 1:100.000¹². Für das Bardet-Biedl-Syndrom sind 16 verschiedene auslösende Genmutationen bekannt und die Erkrankung äußert sich unter anderem durch Malformation des urogenitalen Systems und durch retinale Degeneration¹. Typisch für das Meckel-Gruber-Syndrom sind Lungenhypoplasie sowie weitere Symptome wie Situs inversus oder Nierendysplasie¹. Das Senior-Løken-Syndrom äußert sich okulär durch Retinitis pigmentosa und Leberscher kongenitaler Amaurose¹. Die Erkrankung hat zumeist eine komplette Erblindung zur Folge⁹. Im Auge sind die inneren und äußeren Anteile der retinalen Photorezeptoren über ein „Verbindungszilium“ miteinander verbunden, dessen Fehlfunktion die okuläre Symptomatik erklärt⁸. Insgesamt ist das Senior-Løken-Syndrom ein seltenes Krankheitsbild mit einer Prävalenz von 1:1.000.000¹³. Die Nephronophthise kann anhand des Manifestationszeitpunktes des Nierenversagens in drei Gruppen unterteilt werden. Es wird dabei zwischen infantiler, juveniler und adulter Form unterschieden¹². Die früheste klinische Manifestation zeigt sich bei der infantilen Form. Hier wird das Nierenversagen meist vor dem 4. Lebensjahr erreicht und es kann bereits intrauterin zu Oligohydramnion sowie später zu weiteren Symptomen wie sekundärer Enuresis und Wachstumsretardierung kommen⁹. Die juvenile Form ist die häufigste Form der Erkrankung, beginnt oft im 4.-6. Lebensjahr und führt etwa im 13. Lebensjahr zu terminalem Nierenversagen. Sie tritt durch eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate

und Verlust der tubulären Funktion in Form von Polydipsie und Polyurie in Erscheinung⁹. Bei der adulten Form wird das Nierenversagen durchschnittlich mit 19 Jahren erreicht¹².

Die Nephronophthose kann auf unterschiedliche Mutationen zurückgeführt werden. Sowohl monogene, digene als auch triallele Vererbungen sind für die Erkrankung beschrieben¹¹. Zurzeit sind 20 NPHP Gene (*NPHP1* - 20) sowie einzelne andere Gene bekannt, die mit dem Auftreten der NPH in Verbindung stehen¹¹. 30-60 % der Krankheitsfälle gehen auf Mutationen, meist homozygote Deletionen, von *NPHP1* zurück, das für das Protein Nephrocystin 1 an der Transitionszone des Ziliums kodiert⁸. Der Großteil der übrigen NPHP-Gene kodiert für ziliäre, häufig an der Transitionszone des Zilium lokalisierte Proteine¹¹. Für einen großen Teil der NPH Erkrankungen konnten jedoch bisher keine auslösenden Mutationen identifiziert werden¹¹.

2.2 Primäre Zilien in der Pathologie polyzystischer Nierenerkrankungen

Die Erkrankungen NPH, ADPKD und ARPKD werden als polyzystische Nierenerkrankungen zu den Ziliopathien gezählt¹⁴. Diese Erkrankungen lassen sich zumeist auf Mutationen in Genen zurückführen, die Proteine primärer Zilien kodieren¹⁵. Das primäre Zilium nimmt als Zellorganell eine wichtige Rolle in der renalen Entwicklung ein und ist darüber hinaus an verschiedensten zellulären Mechanismen und Signalwegen beteiligt⁸. Es wird nachfolgend näher eingeführt.

2.2.1 Funktion und Aufbau des primären Ziliums

Primäre Zilien sind antennenartige Organellen, die auf nahezu allen eukaryotischen Zellen vorhanden sind¹⁶. Als sensorische Zellorganellen sind sie ausgehend vom Basalkörper, einer modifizierten Zentriole, an der Zellmembran zu finden¹⁴. In Abgrenzung zu primären, immotilen Zilien gibt es motile Zilien. Diese haben Funktionen beim zielgerichteten Transport von Stoffen durch Bewegung, wie etwa dem von Mukus in der Lunge¹⁴. Auch motile Zilien haben sensorische Funktionen, welche jedoch im primären Zilium überwiegen¹⁷. Seine Funktionen werden nachfolgend näher erläutert.

Primäre Zilien üben verschiedene mechanosensorische sowie chemosensorische Funktionen aus. So nehmen sie Informationen zu Zellschäden, Größe oder Ernährungs- und Energiestatus der Zelle auf und leiten diese weiter¹⁸. In der Niere werden sie durch den vorbeifließenden Urin abgeknickt und vermitteln so Informationen über die Flussrichtung¹⁸. Information über die Flussrichtung extrazellulärer Flüssigkeit ist wichtig für die Polarität der Zellen und damit ihre dreidimensionale Ausrichtung. Hierbei spielen insbesondere der Wnt und der PCP (*planar cell polarity*) Signalweg eine Rolle, auf die das primäre Zilium Einfluss

nimmt ¹⁸. Primäre Zilien sind über vielfältige Signalwege weiterhin an Zellentwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Beispielhaft sind hier der Hedgehog- sowie der PDGF-Signalweg zu nennen ¹⁹. Über den Hedgehog-Signalweg nehmen primäre Zilien Einfluss auf das Zellwachstum und die intrazelluläre Homöostase ¹. Auch sind primäre Zilien über Beteiligung am Auf- und Abbau der Mitosespindel und deren Ausrichtung an Zellzyklusvorgängen beteiligt, ¹⁸. Dies wird in Abschnitt 2.2.2 näher erläutert. Es wird zudem angenommen, dass sie, etwa über den mTOR Signalweg, Einfluss auf Zellvolumen sowie Autophagieprozesse und Apoptose nehmen ²⁰.

Primäre Zilien sind aufgebaut aus dem Zilienaxonem, einer Transitionszone und dem Basalkörper ²¹. Das Zilienaxonem besteht aus zirkulär angeordneten Mikrotubulipaaren und besitzt eine 9 + 0 Struktur. Hier fehlt im Vergleich zum motilen Zilium, die eine 9 + 2 Struktur aufweisen, das zentrale Mikrotubulipaar ¹⁴. Diese 9 + 0 Struktur wird nur nah am Zilium aufrechterhalten. Weiter distal zur Spitze des Ziliums enden die Mikrotubuli teilweise auf unterschiedlichen Längen, sodass sich der Durchmesser des Ziliums an der Spitze bis auf die Hälfte des ursprünglichen Durchmessers minimiert ²². Die Transitionszone bildet den Übergang von Axonem zu Basalkörper und reguliert den Transport zum Zilium. Das Zilienaxonem ist hier mit Y-Stücken an der Plasmamembran fixiert ²³. Der Basalkörper bildet den ziliären Anteil, der in der Zelle verankert ist und entwickelt sich aus der Mutterzentriole des Zentrosoms ¹⁵. Das Zentrosom ist ein nicht membrangebundenes Zellorganell, das aus zwei Zentriolen (Mutter- und Tochterzentriole) und deren umgebender perizentriolarer Matrix besteht. Diese sind durch sogenannte Linker verbunden ²⁴. Funktionell dient das Zentrosom der Organisation von Mikrotubuli insbesondere bei der Zellteilung ²⁵. Die Mutterzentriole bildet den Basalkörper des Ziliums, wovon ausgehend sich 9 distale und subdistale Fortsätze befinden. Die distalen Fortsätze sind für die Membranandockung und Formation und die subdistalen Fortsätze für die Positionierung des Ziliums relevant ²⁴. Um das Zilium während des Zellzyklus schnell auf- und abzubauen und das Mikrotubulusgerüst wieder freizugeben, werden Transportprozesse benötigt ²³. Da innerhalb des Ziliums keine Proteine hergestellt werden können, werden ziliäre Proteine entlang des Ziliums mittels intraflagellarem Transport (IFT) transportiert ²³. Der Transport von der Basis des Ziliums zur Spitze (anterograd) wird durch Komplex B gewährleistet, der mit einem heterotrimeren Kinesin-2-Motor assoziiert ist. Der Transport von der Ziliumpitze zur Basis (retrograd) ist von Komplex A abhängig und von zytoplasmatischem Dynein angetrieben ²⁶. Mutationen in Genen für Proteine des IFT können etwa über fehlerhaften Aktin- und Tubulintransport zu gestörtem Zilienaufbau führen ¹⁴. Auch eine fehlerhafte Ausrichtung der Mitosespindel kann durch Fehlfunktion von IFT-Proteinen bedingt sein und führt über Störungen der Zellteilung zu Hyperproliferation der Nierenzellen und Ausbildung polyzystischer Nieren ²⁷. Eines dieser

Proteine ist etwa IFT172 (NPHP17), was mit der Ausbildung einer Nephronophthise assoziiert ist ⁸.

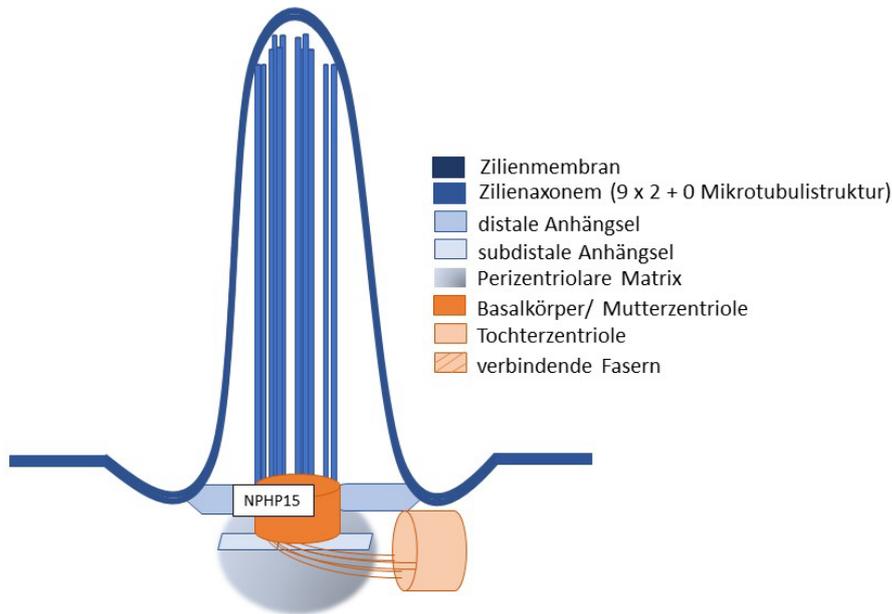


Abbildung 1: Aufbau des primären Ziliums und Lokalisation von NPHP15 am Zentrosom der ziliären Basis.

2.2.2 Der periodische Auf- und Abbau von Zilien

Das primäre Zilium unterliegt einem zellzyklusabhängigen Auf- und Abbau. Dieser findet ausgehend von der Zentriole statt ²¹ (Abb. 2). In der G2-Phase des Zellzyklus reifen die Zentriolen heran und der Basalkörper wird vor der Mitose zur Bildung des Spindelpols freigegeben. Es erfolgt eine Separation zu den Zellpolen ²⁴. Nach der Mitose wird der Spindelapparat zurückgebaut und das Zentrosome wandert zur Zellmembran. In der darauffolgenden G1/0-Phase docken Membranvesikel an das Zentrosom an und der Basalkörper des Ziliums wird aus der Mutterzentriole ausgebildet ²⁴. Für das Andocken und die Positionierung sind Proteine der distalen Anhängsel der Zentriole relevant, zu denen auch NPHP15 (CEP164) sowie weitere zentrosomale Proteine wie CEP83 zählen ²⁸. Daraufhin wird von der Mutterzentriole das zentrioläre *capping*-Protein CP110 entfernt und IFT-Proteine rekrutiert. Zuerst wird dann die Transitionszone des Ziliums formiert und darauf aufbauend das ziliäre Axonem ²⁸. Dies erfolgt in G0. In der folgenden S-Phase wird die Zentriole dupliziert, das Zilium wieder zurückgebildet und von der Zellmembran freigesetzt. Dazu wird der Basalkörper mithilfe von Proteinen wie Aurora Kinase A vom Zilium gelöst und

das Zilium abgebaut²⁹. Das primäre Zilium ist daher nur in der G1-Phase sowie in quieszenten Zellen in der G0-Phase voll ausgeprägt¹⁴.

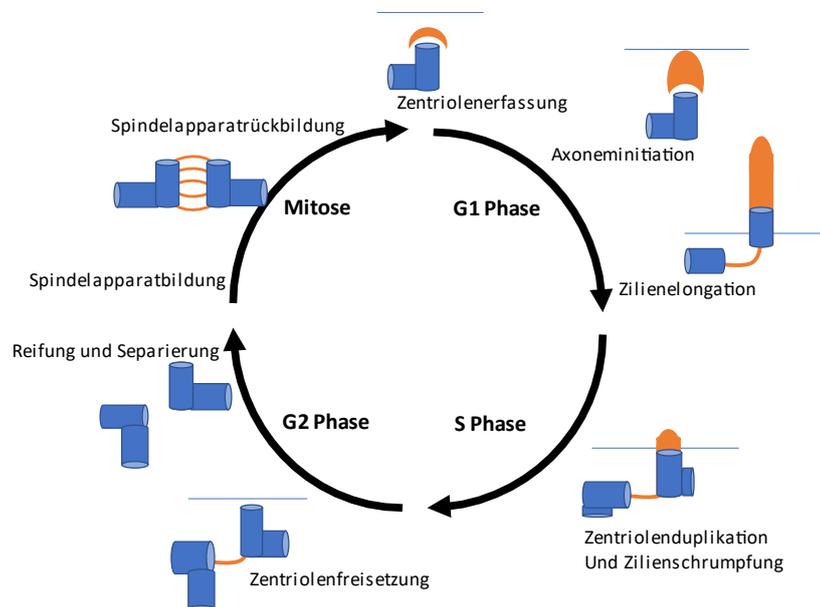


Abbildung 2: Zentriole und Zilium im Zellzyklus

Auf- und Abbau des Ziliums ausgehend von der Zentriole abhängig von den Zellzyklusphasen. Die Zentriole wandert im Zellzyklus zur Zellmembran, welche anhand des blauen Striches zu erkennen ist.³⁰ (Quelle: In Anlehnung an Pan, Snell (2007))

2.2.3 Die Rolle von NPHP15 für die Entwicklung der Nephronophthie

Das in dieser Arbeit näher untersuchte Protein NPHP15 wird auch CEP164 (zentrosomales Protein 164) genannt und wird kodiert durch das Gen *NPHP15*⁹. Sein Name leitet sich vom Molekulargewicht des Proteins von 164 kDa ab⁹. Es setzt sich zusammen aus einer n-terminalen WW-Domäne sowie drei coiled-coil Regionen³¹. Homozygote Mutation sowie kombinierte Heterozygotie des Gens führen u.a. zur Nephronophthie¹⁰. *NPHP15* Mutationen bieten ein breites klinisches Bild und treten durch verschiedene extrarenale Ausprägungen in Erscheinung³². Die Patienten zeigen chronische tubulointerstitielle Nephritiden sowie Fibrose des Nierenparenchyms¹³. Als eins von 9 ziliären Genen ist *NPHP15* mit dem Senior-Løken-Syndrom vergesellschaftet¹³. Die damit einhergehende retinale Degeneration kann bei 10– 15 % der Patienten gesehen werden und im Verlauf in eine Blindheit übergehen⁹.

NPHP15 ist funktionell an Transportprozessen des IFT sowie an der Ausbildung des Ziliums während des Zellzyklus beteiligt ³¹. Um das primäre Zilium auszubilden, müssen die benötigten Membranvesikel vom Golgi-Apparat zu den Zentriolen transportiert werden (Abb. 3). Diese Vesikel docken an der Mutterzentriole an ³³. NPHP15 interagiert hier mit den GTPasen Rab8 und Rabin8, um die Vesikellandockung zu koordinieren ³³. Daraufhin bildet NPHP15 an seinem n-terminalen Ende einen Komplex mit dem Protein TTBK2 an der Mutterzentriole ³⁴. Diese Komplexbildung führt über Phosphorylierungen dazu, dass aus dem transportierten Material das Axonem gebildet wird. Über den IFT werden dann Proteine zur Verlängerung des Axonem geliefert und das Zilium aufgebaut ³³. Weiterhin vermittelt diese Komplexbildung die Entfernung des *capping* Proteins CP110 ²⁸.

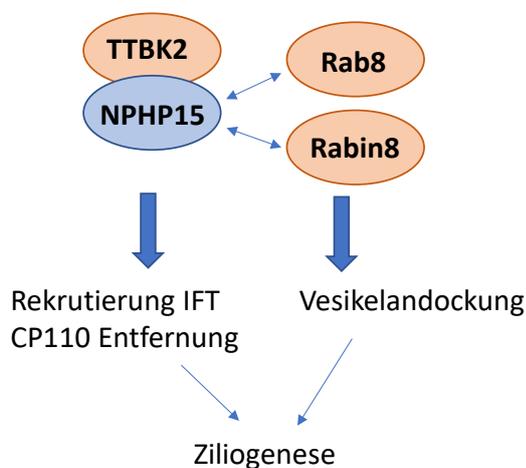


Abbildung 3: Funktion von NPHP15 bei der Ziliogenese

An der Mutterzentriole interagiert NPHP15 mit Rab8 und Rabin8 um die Vesikellandockung zu ermöglichen. In Komplexbildung mit TTBK2 rekrutiert NPHP15 daraufhin Proteine des IFT, um das Zilium aufzubauen und führt zur Entfernung des *capping*-Proteins CP110. ²⁶
(Quelle: In Anlehnung an Čajánek und Nigg (2014))

Darüber hinaus spielt NPHP15 bei frühen Signalwegen für DNA-Reparaturprozesse eine Rolle, indem es die ATR/ATM Signalkaskade aktiviert ³⁵. Bei DNA Schäden kann der G2/M Zellzyklus-Kontrollpunkt mithilfe von NPHP15 aktiviert werden ^{10,35}. Erstmals beschrieben wurde NPHP15 von Graser et al. (2007) ³¹. Es ist primär an den 9 distalen Anhängseln der reifen Zentriole lokalisiert und wird zellzyklusabhängig, vorwiegend zum Ende der S-Phase sowie zu Beginn der G2-Phase synthetisiert ^{10,31}. Der c-terminale Teil ist im Zentrosom verankert und determiniert die Lokalisation von NPHP15 ³³.

Neben NPHP15 existieren weitere ziliäre zentrosomale Proteine, die bei der Pathogenese von Ziliopathien eine Rolle spielen. Einige dieser CEP-Proteine haben Aufgaben beim Auf- und Abbau der Zentriole und bei Kontrollpunkten des Zellzyklus ^{10,31}.

2.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Polyzystische Nierenerkrankungen wie die Nephronophthise sind schwerwiegende genetisch bedingte Erkrankungen, die zu einem progredienten Funktionsverlust der Niere führen. Jedoch ist die Pathophysiologie dieser Erkrankung nur unzureichend verstanden, weswegen es zum jetzigen Zeitpunkt keine kausalen Therapiemöglichkeiten gibt³. Die Auswirkungen von Mutationen in Genen für ziliäre Proteine sind auf molekularer Ebene bisher nicht ausreichend geklärt. Untersuchungen werden dabei dadurch erschwert, dass primäre Zilien aufgrund ihrer geringen Größe wenig Material für biochemische Analysen bieten³⁶.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer neuen humanen Zelllinie des distalen Tubulus auf ihre Selektions- und Transfektionseigenschaften. Parallel liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit darauf, eine HEK293T-Zelllinie zu generieren, welche das zentrosomale Protein NPHP15 gekoppelt an ein 3xFlag-Tag stabil exprimiert. Daraufhin soll die Überprüfung der Funktion des Transgens in der HEK293T-Zelllinie sowie die Untersuchung des Interaktoms der Zellen erfolgen. Mithilfe des Interaktoms dieses ziliären Proteins sollen neue Informationen über die Proteinzusammensetzung des ziliären Basalkörpers gesammelt werden. Zudem sollen durch den Datensatz die Funktion und Lokalisation von NPHP15 näher betrachtet werden, um das Wissen über pathophysiologische Grundlagen der Nephronophthise zu erweitern. So könnten durch die Identifikation neuer Interaktionspartner von NPHP15 Ansätze für die Therapie der Nephronophthise gefunden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Lösungen

Dulbeccos PBS (steril/nicht steril)

136 mM NaCl	Roth
2,7 mM KCl	Roth
6,25 mM Na ₂ HPO ₄ 7xH ₂ O	Merck
1,5 mM K ₂ HPO ₄	Merck
pH 7,4	

PBTx

1X Dulbecco's PBS	Thermo Fisher Scientific
1 mM CaCl ₂	Roth
0,5 mM MgCl ₂ +6H ₂ O	Sigma

Protein Waschpuffer

10 mM TrisHcl pH 7,5	Roth
100 mM NaCl	Roth
0,1% Tween 20	Roth

Laufpuffer

192 mM Glycin	Roth
0,1% SDS	Sigma
25 mM Tris/HCl	Roth
pH 8,3	

Transferpuffer

25 mM Tris pH 8,3	Roth
0,1% SDS	Sigma
192 mM Glycin	Roth
12% Methanol	Roth

Polyacrylamid Gel

Sammelgel

ddH₂O

40% PAA Roth

Sammelgelpuffer pH 6,8 (Puffer B)

- Trizma Hydrochlorid Sigma
- 2 M Trizma Base Sigma
- 20% SDS Sigma
- ddH₂O

10% APS Bio-Rad

0,1% TEMED Sigma

Trenngel

ddH₂O

40% PAA Roth

Trenngelpuffer pH6,8 (Puffer A)

- Trizma Hydrochlorid Sigma
- 2 M Trizma Base Sigma
- 20% SDS Sigma
- ddH₂O

10% APS Bio-Rad

0,05% TEMED Sigma

Entwicklerlösung

Lösung A

ddH₂O

100 mM Tris pH 8,5 Sigma

2,5 mM Luminol Fluka

0,4 mM Cumarsäure Sigma

Lösung B

ddH₂O

100 mM Tris pH 8,5 Sigma

1,5% H₂O₂ Merck

TE Puffer

10 mM TrisHCl Sigma

1 mM Na₂EDTA Sigma

pH 8,0

TAE-Puffer (Gelelektrophorese)

20 mM Tris	Roth
0,06% Eisessig	Sigma
1 mM Na ₂ EDTA	Sigma
0,00005% Ethidiumbromid	Roth

2x Laemmli Puffer

100 mM Tris	Roth
20% Glycerol	Roth
4% SDS	Sigma
0,2% Bromphenolblau	Sigma
100 mM Dithiotreitol	Sigma
pH 6,8	

50mM HEPES

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Roth
280 mM NaCl	Roth
10 mM KCl	Merck
12 mM Dextrose	Roth
1,5 mM Na ₂ HPO ₄	Roth
pH 7,09	

IP Puffer

20 mM Tris pH 7,5	Roth
1 % TX100	Sigma
50 mM NaCl	Roth
25mM Na ₄ P ₂ O ₇	Merck
15mM NaF	Roth
PMSF	Applichem
Na ₃ VO ₄	Sigma

Lysepuffer (Integrations-PCR)

50 mM KCl	Merck
1,5 mM MgCl ₂	Sigma

10 mM TrisCl 8.3	Sigma
0,45% NP-40	Sigma
0,45% Tween 20	Roth

SP3 Lysepuffer

5% SDS	Sigma
1x PBS	Nephrolab

weitere Chemikalien

Agarose	Sigma
BSA zum Blocken 5%	PAA
BigDye Sequencing Puffer	Thermo Fischer Scientific
BigDye Terminator v3.1	Thermo Fischer Scientific
Calciumchlorid 0,25 M	Roth
Chloracetamid (CAA)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Appllichem
DNA Marker (1 kb + 50 bp)	Thermo Fischer Scientific
dNTPs 25 mM	PeqLab
GeneJuice Transfection Reagent	Sigma
Lipofectamin 2000 Reagent	Thermo Fischer Scientific
NDS (Normal donkey serum)	Jackson Immuno Research
PFA 5% (Paraformaldehyd)	Sigma
Polybrene 8 mg/ml	Sigma
Prolong Gold mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)	Thermo Fischer Scientific
Selektionsantibiotika (Blasticidin, Puromycin)	Roth
Tris Puffer pH 8,0	Sigma
Trypsin-EDTA (1X) 0,05%	Sigma

3.1.2 Kits und Verbrauchsmaterialien

Cool Cell Zellfrierbehälter	Biozym
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific
DirectDetect protein concentration kit	SigmaAldrich
Falcons	Corning
Gelkassetten	Novex Life Technologies

Kryo-Röhrchen	Greiner bio-one
LuerLock Spritze 20ml	Braun
M2 Beads	Merck
Objekträger	Engelbrecht
Parafilm	Bemis
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific
PehaSoft Nitril Handschuhe	Hartmann
Pipettenspitzen 10 µl/200 µl/1000 µl	Tip-One Starlab
Pipettenspitzen (steril)	Tip-One Starlab
Pipetten 2,5,20,200,1000 µl	Gilson
PVDF-Membranen	Millipore
PVDF-Filter 0,45 µm	Millex
Stripetten 5 ml/10 ml/25 ml	Corning
Whatmann-Papier	Schleicher & Schuell
Zellkratzer	Corning
Zellkulturschalen	Corning
Zentrifugenflaschen	Beckmann
GeneJet Miniprep Kit	Thermo Fischer Scientific
Gel Purification Kit	Thermo Fischer Scientific
Midi-Präp Extra Kit	Macherey-Nagel

3.1.3 Plasmide

Name	Ursprung
5ht6-Apex.V5 pLenti 6.3	Nephrolab
V5.hCEP164 pcDNA6	Nephrolab
F9.hCEP164 pcDNA6	Nephrolab
Msi1_AAV-CAGGS-GFP (Nterm)	Nephrolab
3xFlag eGFP pcDNA6	Nephrolab
hAAVS1 1R TALEN	Nephrolab
hAAVS1 1L TALEN	Nephrolab
CEP164-3xFlag-AAVS CAG	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
NPHP3-3xFlag-AAVS CAG	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert

3.1.4 Primer

Name	Sequenz	Verwendung	Hersteller
CEP164-V5_fsp	CTTGGGTTTGCTGATGCCGG	Sequencing	IDT
CEP164_fsp1	TGAGAACAAGCCAGCCAG	Sequencing	IDT
CEP164_fsp2	CAGAGGTGCGATCCACAGAG	Sequencing	IDT
CEP164_fsp3	GGCCCATGAACGAGAACTGG	Sequencing	IDT
CEP164_fsp4	GGAAAGGCCACAACCTGCTG	Sequencing	IDT
clamp-mlu-cep164-rp	ccccgcacgcgtGAAGCGATACACCTTC ACTC	Klonierung	IDT
clamp-ecorv-kozal- cep164-fp	ccccgcGATATCaccATGGCTGGACG ACCCCTCCG	Klonierung	IDT
pENTR P3 Be fsp	GGCCTTTTTGTCTACA	Sequencing	IDT
pENTR P3 Be rsp	ATTTTGAGACACGGGCCAGA	Sequencing	IDT
Clamp-Dral-Kozak- CEP164_fp	ccccgc tttaaa acc ATGGCTGGACGACCCCTCCG	Klonierung	IDT
TALEN_seq_rev1	GGG GCT TCA TGA TGT CCC CAT AAT TTT TGG CAG A	Sequenzieru ng	IDT
AAVS1 integration PCR HA-R 2r	GTG AGT TTG CCA AGC AGT CA	Integrations PCR	IDT
AAVS1 integration PCR HA-R 2f	TAT CCG CTC ACA ATT CCA CA	Integrations PCR	IDT
AAVS1 locus	CGGAACTCTGCCCTCTAACG	Integrations PCR	IDT

3.1.5 Bakterien

DH10 *E. Coli* Bakterien

Top10 Bakterien

SOC Medium

LB-Medium

LB-Platten (mit Ampicilin, Kanamycin)

Thermo Fischer Scientific

Thermo Fischer Scientific

Thermo Fischer Scientific

Roth

Roth

3.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Verwendung	Verdünnung	Seriennummer	Hersteller
anti-Flag monoklonal	Maus	Western Blot	1:10.000	F3165	Sigma
anti-Flag polyklonal	Kaninchen	Western Blot	1:10.000	F7425	Sigma
anti-V5 monoklonal	Maus	Western Blot	1:5000	MCA1360	Serotec
anti-V5 polyklonal	Kaninchen	Western Blot	1:5000	AB3792	Millipore
anti-GFP monoklonal	Maus	Western Blot	1:1000	sc-9996	Santa Cruz
anti-GFP polyklonal	Kaninchen	Western Blot	1:1000	sc-8334	Santa Cruz
anti-V5	Maus	IF	1:1000	MCA1360A488	Serotec
Anti-ARL13B	Kaninchen	IF	1:500	17711-1-AP	Proteintech
Anti- Acetyliertes Tubulin	Maus	IF	1:1000	T6793	Sigma

Sekundärantikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Verwendung	Verdünnung	Seriennummer	Hersteller
anti-Maus-Fc IgG HRP	Ziege	Western Blot	1:30.000	111-035-003	Jackson (H/L) Immuno Lab
anti- Kaninchen-Fc IgG HRP	Ziege	Western Blot	1:30.000	111-035-003	Jackson (H/L) Immuno Lab

anti-Maus-IgG Cy3	Esel	IF	1:500	715-165-150	Jackson (H/L) Immuno Lab
anti- Kaninchen- IgG Cy3	Esel	IF	1:500	711-165-152	Jackson (H/L) Immuno Lab
anti-Maus-IgG Cy5	Esel	IF	1:500	715-175-150	Jackson (H/L) Immuno Lab
anti- Kaninchen- IgG Cy5	Esel	IF	1:500	111-175-144	Jackson (H/L) Immuno Lab
anti-Maus IgG Alexa 488	Esel	IF	1:500	715-545-150	Invitrogen
anti- Kaninchen IgG Alexa 488	Esel	IF	1:500	711-545-152	Invitrogen

3.1.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

New England Biolabs

Shrimp alkaline Phosphatase (rsap)

New England Biolab

Exonuclease I Sap

New England Biolabs

T4 Ligase

Thermo Fischer Scientific

Q5 High-Fidelity Polymerase

New England Biolabs

Benzonase HC Nuclease (MS)

Sigma

10x T4 Ligasepuffer

Thermo Fischer Scientific

Puffer Cutsmart

New England Biolabs

Puffer 3.1

New England Biolabs

Proteinase K

Thermo Fischer Scientific

5x Q5 Reaction Buffer

New England Biolab

3.1.8 Zellen und Zellmedien

Verwendete Zelllinien

CCD_RCC-Zellen (humane distale Tubuluszellen)
HEK293T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)

Nephrolab
Prof. Dr. B.Seed

Medium für CCD_RCC-Zellen

Dulbecco DEMEM/F12 Medium
10% FBS (fetales bovines Serum)
1% Glutamax

Sigma
Biochrom AG
Thermo Fischer Scientific

Hungermedium für CCD_RCC-Zellen

Dulbecco DEMEM/F12 Medium
1% Glutamax

Sigma
Thermo Fischer Scientific

Medium für HEK293T-Zellen

DEMEM/F12 Medium
10% FBS

Sigma
Biochrom AG

Optimem Medium

Gibco

3.1.9 Geräte

Zentrifugen

Name	Seriennummer	Hersteller
Zentrifuge 5424 R	5404000010	Eppendorf
Heraeus Megafuge	10369074	Beckmann
Zentrifuge 5427 R	5409000210	Eppendorf
Zentrifuge 5804 R	5804000320	Eppendorf
Optima Max XP Ultrazentrifuge	393315	Beckmann

Mikroskope

Name	Seriennummer	Hersteller
Apotome.2		Zeiss
Leica DMIL LED	MC-0000059	Leica
Nikon Diaphot-TMD	3344577	Nikon

Konfokales Mikroskop	TCS SP8 MP-OPO	Leica
----------------------	----------------	-------

Cycler

C1000 Touch Thermal Cycler	Biorad
DNA Engine Cycler	Biorad

Weiteres

Autoklave VX-150	Systemec
Bioruptor	Diagenode
DNA Gelkammern	Peqlab/ intas
Fusion Solo Chemiluminometer	Vilber
Geldokumentationsgerät	Intas
Heizblock	Stuart Scientific
Heraus Function Line Brutschrank	Thermo Fischer Scientifi
Inkubatoren Zellkultur	Binder
Inkubationsschüttler Multitron	Infors HT
NanoDrop 1000	Peqlab
P-Touch Gerät	Brother
S1-Zellkulturbank	Binder
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex Reax 2000	Heidolph
Western Transfermaschinen Western	Peqlab
Western Laufkammern Novex Minicell	Invitrogen

3.1.10 Software

Fiji ImageJ 1.52e
 FusionCapt Advance Solo 7 17.04a
 Benchling.com
 Zeiss ZEN Digital Imaging 3.0 (blue edition)
 Leica LAS X Life Science
 INTAS GelDoc 2019
 MaxQuant
 Perseus
 Funrich
 Microsoft Exce

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese können durch Anlegen einer Spannung DNA-Fragmente entlang eines Polymergels anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Da die Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie in Richtung des Pluspols durch die Poren des Gels³⁷. Dazu wurden die DNA-Proben mit einem Ladefarbstoff vermischt, der die Probe beschwert. Je nach Größe des erwünschten Fragmentes wurden die Proben auf ein 1 oder 2% Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde in eine Kammer mit TAE-Puffer gegeben, an die eine Spannung angelegt werden kann. Im Gel, sowie in der Flüssigkeit der Kammer, befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dieser interkaliert mit der DNA³⁸. Durch eine UV-Kammer können die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Durch Mitführen eines Markers konnte die Größe des Fragmentes bestimmt werden.

3.2.2 Molekulares Klonieren

In dieser Arbeit wurden die TALEN Plasmide CEP164-3xFLAG-AAVS CAG (Abb. 4) und NPHP3-3xFLAG-AAVS CAG kloniert. Dazu wurden CEP164-3xFlag sowie NPHP3-3xFlag in den humanen Vektor Msi2-GFP-AAVS CAG kloniert. Diese Vektoren ermöglichen eine Expression des jeweiligen Transgens im AAVS-Lokus innerhalb des PPP1R12C-Gens unter dem CAG-Promotor im Genom der Zielzellen. Durch die Integration des Transgens in den *Safe harbour* AAVS-Lokus bleibt die Funktionalität des Transgens gewahrt und es entsteht kein Risiko für den Wirt. Der Locus steht unter Kontrolle des CAG-Promotors, durch den eine spätere stabile Expression in den Zielzellen gewährleistet wird³⁹. Zur Herstellung der Expressionsvektoren wurde mittels Restriktion und Ligation kloniert. Zuerst wurde die GFP-Sequenz aus dem Plasmid herausgeschnitten und durch ein 3xFlag-Tag ersetzt. Dadurch wurde der Vektor Msi2-3xFlag-AAVS CAG kloniert. Die Integration des 3xFlag-Tags wurde durch Sequenzierung der beiden Schnittstellen verifiziert. Angrenzend an das 3xFlag-Tag wurde daraufhin CEP164 beziehungsweise NPHP3 in den Vektor integriert. Der Zielvektor CEP164.3xFlag-AAVS CAG TALEN konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich kloniert werden. Für die darauffolgende Herstellung einer stabilen Zelllinie mit diesem Vektor wurden TALEN zur Genomeditierung verwendet.

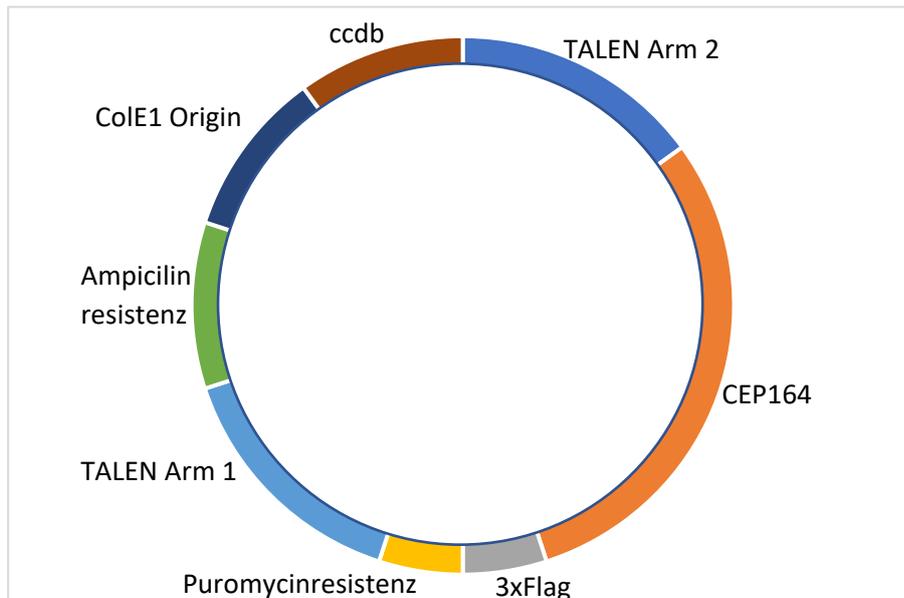


Abbildung 4: Plasmidkarte des CEP164.3xFlag AAVS CAG TALEN Plasmids

Schematischer Aufbau des CEP164.3xFlag AAVS CAG TALEN Plasmids. Der Einfachheit halber sind nicht alle Anteile des Plasmids dargestellt. Das Plasmid enthält die zur Klonierung mittels TALEN notwendigen TALEN-Erkennungssequenzen sowie das zu integrierende Transgen CEP164.3xFlag. Angrenzend an diese Integrationsequenz befindet sich die Puromycinresistenz. Das Plasmid enthält zudem weitere notwendige DNA-Abschnitte wie den Replikationsursprung oder Antitoxinsysteme.

3.2.2.1 Q5 PCR

Die einzufügende Zielsequenz wurde durch Q5-PCR bei *CEP164* und *NPHP3* von einem Plasmid amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden mithilfe von Benchling entworfen und von IDT hergestellt.

Q5 PCR Programm

Vorgang	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98°C	30 s
35 Zyklen	98°C	5 s
	67-72°C (primerabhängig)	30 s
	72°C	30 s /kb (fragmentlängenabhängig)
Finale Extension	72°C	2 min

Um bei den Klonierungen unspezifische Nebenprodukte zu vermeiden, wurde zur Kontrolle 5 µl des PCR-Produktes auf ein kleines 2% Agarosegel bei 120 V für 45 min aufgetragen. Waren unspezifische Banden sichtbar, wurde das gesamte PCR-Produkt auf ein Gel

aufgetragen und nur die spezifische Bande ausgeschnitten. Daraufhin wurde dieses Gelfragment sowie im anderen Fall das PCR-Produkt mithilfe eines Gelextraktionskits aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurden durch Verdau mit Restriktionsenzymen Überhänge an der Zielsequenz erzeugt. Für das Einfügen von *CEP164* sowie *NPHP3* in die TALEN-Plasmide wurde mit EcoRV/Mlu geschnitten.

Plasmidvektor und PCR-Produkt der Zielsequenz wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Von beiden Produkten wurden zur Kontrolle erneut 5 µl mit 10µl H₂O auf ein 2% Agarosegel mit 2 µl Loading Dye aufgetragen.

Restriktionsverdau Zielsequenz Pipettierschema

Menge	Substanz
0,5 µl	Enzym 1
0,5 µl	Enzym 2
3 µl	Puffer
30 µl	Aufgereinigtes PCR-Produkt

Restriktionsverdau Vektor Pipettierschema

Menge	Substanz
0,5 µl	Enzym 1
0,5 µl	Enzym 2
3 µl	Puffer
	Vektor 2 µg
30 µl Gesamtvolumen	Auffüllen mit H ₂ O

3.2.2.2 Ligation

Da nun beide Teile des zukünftigen Zielvektors komplementäre Überhänge besaßen, konnte die Ligation durchgeführt werden. Dazu wurden Zielsequenz und Vektor bei Raumtemperatur für 2 h ligiert und die Reaktion bei 65°C für 10 min abgestoppt. Das Ligationsverhältnis von Vektor und Zielsequenz sollte durch das Ergebnis der Elektrophorese der beiden Restriktionsprodukte anhand der Bandendicken abgeschätzt werden. Ziel war es ein gleiches Verhältnis von Zielsequenz und Vektor zu schaffen. Als Negativkontrolle wurde der Vektor ohne Zugabe der Zielsequenz ligiert.

Ligation Pipettierschema

Menge	Substanz
	Vektor
	Zielsequenz
0,4 µl	T4 Ligase
2,1 µl	10xT4 Ligasepuffer
21 µl Gesamtvolumen	Auffüllen mit H ₂ O

3.2.2.3 Transformation

Das Ligationsprodukt wurde in DH10 Bakterien transformiert, wovon 150 µl auf einer Nährmediumplatte mit Antibiotikum ausgestrichen wurden. Durch die im Vektor integrierte Antibiotikaresistenz wurde gewährleistet, dass nur Bakterien wachsen, die das Plasmid integriert hatten. Als Negativkontrolle wurde der Vektor ohne Zielsequenz verwendet.

Transformation

50 µl Bakterien + 3 µl Ligationsreaktion	
30 min	auf Eis
45 s	42°C im Wasserbad
2 min	auf Eis
Zugabe 500 µl SOC-Medium	
1 h	37°C und 700 rpm
Drei- Ösenausstrich auf LB-Platte	

3.2.2.4 Plasmidisolaton

Über Nacht inkubierte die Platte mit den DH10 Bakterien bei 37°C. Nach 14-16 h wurden von der Platte 2-6 Kolonien gepickt und in je 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum wiederum bei 37°C und 120 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Minipräparation durchgeführt. Dabei werden die Zellen alkalisch lysiert, aufgereinigt und in 10 mM Tris-HCL eluiert. Die isolierte DNA wurde mittels Kontrollverdau und Sanger Sequenzierung verifiziert.

Konnte das gewünschte Plasmid nachgewiesen werden, wurde eine Kultur für eine Midipräparation aus 200 ml ddH₂O, 4 g LB-Medium und 200 µl Antibiotikum über Nacht angesetzt. Dazu wurde der Rest der vorhandenen Minikultur gegeben. Die DNA wurde am nächsten Tag mittels eines Midipräparationskits isoliert und in 10 mM Tris Puffer pH 8,5 gelöst. Die Verifizierung des Plasmids erfolgte mit den vorherig genannten Methoden.

Kontrollverdau Pipettierschema

Menge	Substanz
0,3 µl	Enzym 1
0,3 µl	Enzym 2
1,5 µl	Puffer
500 ng	DNA
Gesamtvolumen 15 µl	Auffüllen mit H ₂ O

3.2.2.5 Sanger Sequenzierung

Zur Sequenzierung der hergestellten Plasmide nach dem Sanger-Verfahren wurden die Dienstleister CCG Sequencing Service und Microsynth Sequencing Labor in Anspruch genommen. Von einem Didesoxynukleotidprimer ausgehend wird mithilfe der Didesoxymethode sequenziert. Der gewünschte Teil des Plasmids wird durch eigens hergestellte Primer spezifisch mithilfe einer DNA-Polymerase vervielfältigt. In dem Reaktionsgemisch befinden sich neben dNTPs zudem fluorophormarkierte ddNTPs, die zum Kettenabbruch führen.⁴⁰ Die entstehenden Stücke der Polymerisierung werden nach Größe durch Elektrophorese aufgetrennt^{40,41}. So kann durch die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren der ddNTPs jeder Position im DNA-Strang einer Farbe und somit einer Base zugeordnet werden⁴¹.

Microsynth Seqlab Pipettierschema

Menge	Substanz
3 µl	Primer 10 µM
800 ng	DNA
Gesamtvolumen 15 µl	Auffüllen mit H ₂ O

CCG Sequencing Pipettierschema

Menge	Substanz
0,25 µl	BigDye Terminator v3.1
2,25 µl	5x BigDye Sequencing Buffer
0,25 µl	Primer 1 µM
180 ng	Plasmid DNA
Gesamtvolumen 10 µl	Auffüllen mit H ₂ O

CCG Sequencing PCR Programm

Vorgang	Temperatur	Dauer
1	96°C	1 min
2	96°C	10 s
3	55°C	5 s
4	60°C	4 min
5	8°C	halten
2-4	39 Wiederholungen	

3.2.3 Kultivieren und Passagieren von Säugerzellen

Die Experimente wurden zunächst mit CCD_RCC-Zellen durchgeführt. Dies sind humane Zellen des distalen Tubulussystems der Niere, welche im nephrologischen Forschungslabor immortalisiert wurden. Die Zelliniengenerierung sowie die Experimente zur Erstellung des Interaktoms wurden in HEK293T Zellen (=humane embryonale Nierenzellen) durchgeführt.

In der Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet und die Arbeitsfläche sowie die Materialien mit 70% Ethanol desinfiziert. Die CCD_RCC-Zellen sowie die HEK293T Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen bei 37°C im Brutschrank kultiviert mit 5% CO₂ Begasung. Zur Subkultivierung der Zellen wurden die CCD_RCC-Zellen entweder 1:3 über 2 Tage oder 1:4 über 3 Tage geteilt. Die IMCD-Zellen wurden 1:10 über 2 Tage und 1:20 über 4 Tage geteilt. Dazu wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37°C für 3-4 min inkubiert. Daraufhin wurde die Trypsinisierung durch Zugabe von Medium abgestoppt und die Zellen durch hoch- und runter pipettieren vereinzelt. Die neuen Kulturschalen wurden mit Medium vorbereitet und die gewünschte Menge Zellen zu dem Medium hinzugegeben. Da in früheren Studien gezeigt wurde, dass Entzug von Serum bei den Zellen zur Induktion von Zilienwachstum führt, wurden für einige Versuche (wie etwa der Immunfluoreszenz, siehe 1.2.9) die Zellen einem Hungermedium ohne Serum für 24 oder 48 h ausgesetzt ⁴².

3.2.4 Einfrieren von Säugerzellen

Die Zellen wurden zur längeren Lagerung in speziellen Kryo-Röhrchen eingefroren. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen, trypsinisiert, resuspendiert, in ein Falcon überführt und 5min bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in einem Milliliter Medium welches zu 90% aus FBS und 10% aus DMSO besteht resuspendiert und in das Kryo-Röhrchen überführt. Um Zellschäden durch das Einfrieren zu

vermeiden, wurden die Zellen im Zellfrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert und erst am nächsten Tag in den flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

3.2.5 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Transfektion beschreibt den Vorgang, bei dem in eukaryotische Zellen Fremd DNA oder RNA eingebracht wird. Dies kann auf verschiedenen Wegen erfolgen ⁴³. Es wurden, abhängig der verwendeten Zelllinie, die näher erläuterten Methoden verwendet. HEK293T-Zellen wurden mit der Calcium-Phosphat Methode transfiziert. CCD_RCC Zellen wurden mit Lipofectamin 2000 Reagenz und für vereinzelte Experimente mit GeneJuice transfiziert.

3.2.5.1 Calcium-Phosphat-Methode

Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wird die einzubringende DNA durch die Bildung von Calciumphosphat-Copräzipitaten gebunden. Diese Komplexe können daraufhin durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden ⁴⁴.

Dazu werden bei einer 10cm Kulturschale zu $10\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA, beziehungsweise $2\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA der GFP-Kontrolle zuzüglich $8\ \mu\text{g}$ des Leervektor, $500\ \mu\text{l}$ Calciumphosphat gegeben und unter Vortexen wird $500\ \mu\text{l}$ 2xHEBS tropfenweise hinzugegeben. Von diesem Gemisch werden $980\ \mu\text{l}$ schneckenförmig von außen nach innen auf die zu 60% konfluenten HEK293T Zellen im Medium gegeben und in den Brutschrank gestellt. Nach 6-8 h wurde das Medium gewechselt und am nächsten Tag die Transfektionseffizienz mittels der GFP-Kontrolle überprüft. War diese positiv, konnten die Zellen geerntet werden.

3.2.5.2 Lipofectamin 2000 Reagenz

Bei der Transfektion mit dem Lipofectamin 2000 Reagenz wird die Plasmid-DNA durch Liposomen komplexiert und daraufhin durch Endozytose in die Zelle aufgenommen ⁴⁵.

Für ein 6-well wurden $0,5\text{-}2\ \mu\text{g}$ DNA zu $150\ \mu\text{l}$ Optimem Medium gegeben und mit einem Gemisch aus $6\ \mu\text{l}$ Lipofectamin und $150\ \mu\text{l}$ Optimem Medium für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde das volle Volumen auf die zu 70 % konfluenten Zellen schneckenförmig gegeben. Am nächsten Tag konnten die Zellen weiterverarbeitet werden.

3.2.5.3 GeneJuice

Die Transfektion mit GeneJuice Reagenz wird mit 80% konfluenten Zellen durchgeführt. Im ersten Schritt werden zu $100\ \mu\text{l}$ Optimem Medium $3\ \mu\text{l}$ GeneJuice Reagenz gegeben und

gevoertext. Das Gemisch wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin 1 µg Plasmid DNA hinzugegeben. Durch vorsichtiges hoch- und runterpipettieren wird dieses vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation wiederum bei Raumtemperatur wird das Gemisch tropfenweise auf die Zellen im Nährmedium gegeben.

3.2.6 Zellen ernten

Um Gesamtzelllysate der Zellen zu erhalten, wurde das Medium abgenommen, die Zellen in kaltem PBS gewaschen und resuspendiert, im Falle der CCD_RCC und IMCD-Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellkratzers. Die Zellen wurden 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde abhängig vom Zelltyp entsprechend seiner Größe in einem bestimmten Volumen 1x Laemmli resuspendiert. Daraufhin wurde es für 5 min bei 95°C aufgekocht und bei -20°C gelagert.

3.2.7 Generierung stabiler TALEN Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine transgene *humane single copy* Zelllinie hergestellt, welche *NPHP15* an 3xFlag gekoppelt stabil in den AAVS1 (= *adeno associated virus*) Locus integriert hat (Abb. 5). Dieser befindet sich auf Intron 1 der Phosphatase 1 auf Chromosom 19 des humanen Genoms⁴⁶. Um eine effiziente und stabile Integration des Transgens (CEP164-3xFlag) in das Genom der Zielzellen zu garantieren, wurden TALEN verwendet. TALEN (= *transcription activator like effector nuclease*) sind künstliche Restriktionsenzyme, die im Bereich der Genomeditierung eingesetzt werden⁴⁷. Sie setzen sich aus einer DNA-bindenden Domäne, dem TAL-Effektor, und einer Endonuklease (FokI) zusammen⁴⁸. Der TAL-Effektor besitzt eine variable Region (RVD) von 33 bis 35 Aminosäuren, wodurch eine beliebige DNA-Sequenz spezifisch gebunden werden kann, um gezielt DNA zu schneiden⁴⁷. Da die Endonukleasen nur als Dimere einen Doppelstrangbruch herbeiführen, wird immer ein R/L TALEN Paar verwendet⁴⁹.

Das TALEN-System wurde unter Verwendung der Homologie der AAVS1-Integrationsstelle konzipiert. Für die Funktion des TALEN-Systems werden zwei Plasmide mit jeweils einem TALEN-Arm benötigt, welche die Endonuklease sowie die Stelle des geplanten Doppelstrangbruches im humanen Genom codieren (hAAVS1 1L TALEN und hAAVS1 1R TALEN). Die TALEN-Arme nutzen den AAVS1 Locus als Erkennungssequenzen, woraufhin die Endonukleasen einen Doppelstrangbruch (DSB) im AAVS1-Locus des Genoms herbeiführen. Dieser DSB induziert den zelleigenen Reparaturmechanismus des HDR (*homology directed repair*), wodurch das Transgen in das Genom der Zellen integriert wird.

Es werden 80% konfluente HEK293T-Zellen mit dem Zielsequenz tragenden Plasmid zusammen mit hAAVS1 1L TALEN und hAAVS1 1R TALEN (TALENs) transfiziert. Die Experimente wurden vor der Austestung der Transfektionseffizienz durchgeführt, weswegen Lipofectamin 2000 als Transfektionsreagenz verwendet wurde. Als Kontrolle diente eine Zellkulturschale, die mit dem Zielplasmid und nur einem TALEN-Arm transfiziert wird. Zur Selektionierung der Zellen wurde Puromycin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml verwendet. Zur Bestimmung der Antibiotikakonzentration, die das Überleben von Zellen ermöglicht, die die gewünschte DNA-Sequenz integriert haben, wurde im Vorhinein eine Titrationskurve der Zellen mit Antibiotikakonzentrationen von 0,5-20 µg/ml durchgeführt. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

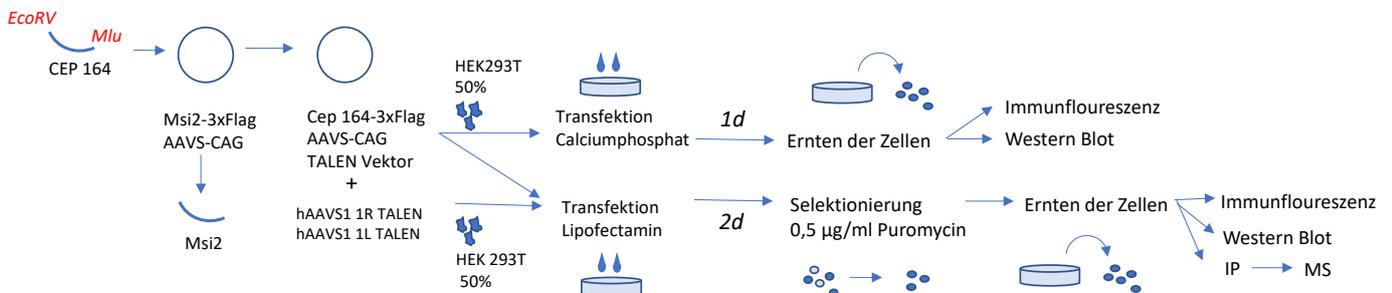


Abbildung 5: Herstellung stabiler transgener *single copy* Zelllinien mit TALEN

Schematisches Vorgehen der Klonierung des CEP164.3xFlag-AAVS-CAG TALEN Plasmids mit Restriktion und Ligation. Dieses wird in Überexpression in HEK293T-Zellen getestet. Nachfolgend wird mithilfe von TALEN eine HEK293T Zelllinie hergestellt, die CEP164.3xFlag stabil exprimiert. Daraufhin soll die Funktion des Transgens durch Western Blot und Integrations-PCR verifiziert werden, sowie das Interaktom von NPHP15 durch Massenspektrometrie bestimmt werden.

3.2.7.1 Integrations PCR für TALEN Zelllinien

Um die stabile Integration des Transgens in die HEK293T-Zellen in einem ersten Schritt zu verifizieren, wurde eine Integrations-PCR mit genomischer DNA durchgeführt. Für dieses Verfahren wurden 3 spezifische Primer benötigt. Zwei davon binden außerhalb der *single copy integration region* jeweils *down-* oder *upstream*, einer bindet innerhalb. Die PCR-Produkte wurden dann auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Der Wildtyp führt bei dieser PCR zu einer Bande bei 1935 bp. Hier binden die beiden außerhalb der *single copy integration region* gelegenen Primer. Ist keine Bande bei dieser PCR-Reaktion sichtbar handelt es sich um die integrierte Form. In diesem Fall ist das PCR-Produkt zu groß um eine Bande auf dem Gel zu zeigen.

Einer der Primer bindet innerhalb der *single copy integration region* und kann mit einem der außerhalb der *single copy integration region* gelegenen Primer ein PCR-Produkt bilden. Es kommt bei dieser Reaktion nun entweder zu einer Bande bei 1180 bp wenn das Transgen integriert ist oder es ist keine Bande sichtbar. Dies zeigt dann, dass der AAVS1 Locus leer ist. Des Weiteren kann durch Anzahl der Banden bestimmt werden, ob es sich um eine heterozygote (Bande auf Höhe des Wildtyps sowie auf Höhe der Integration des Transgens) oder homozygote (Bande auf Höhe des Transgens) Integration handelt.

Für die PCR wurden die Zellen auf 6-well Zellkulturschalen angezüchtet. Zu den Zellen wurden jeweils 100 µl Lyse Puffer sowie 1 µl 20 mg/ml Proteinase K hinzugefügt. Daraufhin wurden die Zellen bei 56 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert und daraufhin 5-10 min bei 95 °C erhitzt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 1-2 µl DNA für die Integrations PCR eingesetzt.

Pipettierschema Integrations PCR

Menge	Substanz
10 µg	5x GoTaq Green Flexi Puffer
3 µg	MgCl ₂
0,4 µg	dNTPs 25mM
6 µg	Primer Mix 5 µM
0,24 µg	GoTaq HotStart Polymerase
1 µg	DNA
29,35 µg	ddH ₂ O

Integrations PCR Programm

Vorgang	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	2 min
34 Zyklen	95°C	30 sec
	59°C	45 sec
	72°C	2 min
Finale Extension	72°C	5 min

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Durch Immunfluoreszenzfärbung können spezifisch Proteine in Gewebsschnitten oder Zellen nachgewiesen und lokalisiert werden. Dazu wird ein unmarkierter Erstantikörper benötigt, dessen Epitop an das zu untersuchende Protein bindet. Die Sichtbarmachung erfolgt daraufhin durch einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper ⁵⁰.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 80-90 % konfluente CCD_RCC auf Deckgläschen eingesetzt. Diese waren direkt fixiert worden, sowie vorher teilweise 24 h oder 48 h Hungermedium ausgesetzt. Sie wurden dreimalig für je 5 min mit kaltem PBS gewaschen und mit 4 % PFA für 15 min fixiert. Daran anschließend erfolgten erneut 3 Waschschr itte mit PBS. Daraufhin wurden die Färbungen mit 5 % Eselserum in PBTx für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS+ wurde der in PBTx verdünnte Erstantikörper über Nacht bei 4°C appliziert. Nach erneutem Waschen wurde am nächsten Tag für eine Stunde der Zweitantikörper bei Raumtemperatur in Dunkelheit appliziert. Auch danach erfolgten die Waschschr itte, ein Waschschr itt mit VE-Wasser und die Fixierung auf dem Objektträger mit Prolong Gold +DAPI. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

3.2.9 Western Blot

Der Western Blot dient der Auftrennung eines Proteingemisches nach Größe auf einem PAA (=Polyacrylamid) Gel. Durch Anlegen einer Spannung an das Gel wandern die Proteine durch das Gitternetz des Gels und werden so nach ihrer Größe aufgetrennt ⁵¹. Nach der Auftrennung im Gel wurden die Proteine durch einen Semi-Dry Transfer auf einer Polyethylenmembran fixiert.

Nach dem Transfer wurden mit 5 % BSA alle freien Bindungsstellen geblockt, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Danach wurde die Membran dreimalig für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und der Erstantikörper bei 4°C über Nacht appliziert. Der Zweitantikörper, der spezifisch an den Erstantikörper bindet und nach dreimaligem Waschen für 1 h bei Raumtemperatur appliziert wurde, ist Chemilumineszenz markiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde auf die Membran die Mischung aus 500 µl Entwicklerlösung A und 500 µl Entwicklerlösung B gegeben und die Membran unter die Detektionskamera gelegt. Durch die Chemilumineszenz konnten so spezifisch die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

Phase	Dauer	Einstellung
Sammelphase	30 min	70 V

Trennphase	1 h 30 min – 2 h 15 min (Proteingrößenabhängig)	30 mA
Transfer	53 min – 1 h 10 min (Proteingrößenabhängig)	12 V

3.2.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient dem Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen⁵². Dazu wird durch einen Antikörper ein Antigen mitsamt seiner Interaktionspartner in einem *pull down*-Assay aus einem Proteingemisch herausgezogen⁵². Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der das 3xFlag Konstrukt bindet. Durch die Fusion als Transgen mit *CEP164* (*NPHP15*) werden dadurch die Interaktionspartner von NPHP15 herausgezogen. Die präzipitierten Proteine werden aufgereinigt und konnten nachfolgend mithilfe Western Blot und MS detektiert werden. Als Kontrollzelllinie wurden Wildtyp HEK293T-Zellen verwendet.

Für die Immunpräzipitation wurden 10 cm Schalen der Zellen geerntet. Als erster Schritt erfolgte die Lyse der Zellen. Dazu wurden die Zellen in 1 ml IP-Puffer, Na₃VO₄ und PMSF resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis belassen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C. Um das Lysat noch reiner zu machen wurde daran eine Ultrazentrifugation mit 45 000 rpm für 30min bei 4°C angeschlossen. Vom Überstand nach der Zentrifugation wurden 30 µl abgenommen und im späteren Schritt als Lysatproben mit 50 µl Laemmli mit auf den Western Blot geladen. 750 µl des Überstandes wurden für die weitere IP abgenommen und dazu 30 µl M2 Beads gegeben. Die Proben inkubierten über Nacht im Overhead Shaker bei 4 °C. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C für 2 min und der Überstand wurde abgenommen.

Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, mussten die IP-Proben aufgereinigt werden. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen der Proben mit einer Lösung aus je 1 ml IP-Puffer und anschließender Zentrifugation sowie Abnahme des Überstandes. Die Hälfte der Proben wurde für die Massenspektrometrie weiterverwertet, zu den übrigen IP-Proben wurde 50 µl 1x Laemmli zugegeben. Diese IP-Proben wurden dann bei 95°C für 5 min erhitzt und jeweils 15 µl zusammen mit den Lysatproben als Test IP auf einen 2 % Western Blot geladen.

Die Proben für die Massenspektrometrie wurden mit dem SP3-Protokoll der CECAD *Proteomics Core Facility* weiterverarbeitet. Dazu wurden die gewaschenen Proben in SP3-Lyse Puffer, welcher 5% SDS enthält um das Chromatin zu degradieren, im 1:1 Verhältnis lysiert. Danach wurde zu den Proben DDT bis zu einer finalen Konzentration von 5 mM hinzugegeben, auf dem Vortex geschüttelt und bei 55°C für 30 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurde CAA bis zu einer finalen Konzentration von 40 mM hinzugegeben, wieder auf

dem Vortex geschüttelt und die Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln für weitere 30 min inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 g für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde gemessen und daraufhin bei -20°C eingefroren.

3.2.11 Massenspektrometrie

Zur Erstellung der Interaktomdaten der CEP164.3xFlag-AAVS CAG HEK-Zelllinie wurde Massenspektrometrie eingesetzt. Massenspektrometer setzen sich aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor zusammen. Die Ionenquelle dient der Ionisation der Probe und Entfernung der Elektronen. Im Analysator werden die Ionen nach Masse/Ladung selektiert und zuletzt durch den Detektor anhand ihrer Ablenkung detektiert⁵³. Dabei gibt der Radius der Kreisbahn auf denen die Ionen abgelenkt werden Auskunft über die Masse der Ionen (je höher die Masse, desto größer der Radius) und diese können dadurch identifiziert werden⁵³.

Die Messungen der immunpräzipitierten und eingefrorenen Proben (siehe 1.2.11) erfolgten über die *Proteomics Core Facility* des CECAD Köln. Es wurde eine Offline-Peptidfraktionierung durch Umkehrphasenchromatographie durchgeführt. Die nachfolgende Auswertung der Messungen erfolgte mit den Programmen MaxQuant und Perseus.

4 Ergebnisse

4.1 Selektions- und Transfektionseigenschaften einer humanen Zelllinie des distalen Tubulus

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die humane Zelllinie CCD_RCC (*kidney collecting duct renal carcinoma cells*) in Bezug auf ihre Selektions- und Transfektionseigenschaften untersucht. Die Untersuchungen lieferten einen Ansatzpunkt zur zukünftigen Planung und Herstellung weiterer transgener Linien mit diesen Zellen. Bei den CCD_RCC-Zellen handelt es sich um Nierenzellkarzinomzellen des distalen Tubulussystems der Niere. Sie wurde im nephrologischen Forschungslabor aus einer Nephrektomieniere isoliert und konnten in Vorarbeiten bereits immortalisiert werden. Zunächst konnte verifiziert werden, dass CCD_RCC-Zellen in der Lage sind primäre Zilien auszubilden. Durch Serumentzug und nachfolgende Immunfluoreszenzfärbung gegen ziliäre Marker konnte gezeigt werden, dass eine Wachstumshemmung von 48 Stunden zu Ausbildung primärer Zilien in den Zellen führt (Abb. 6). Die primären Zilien, in der Abbildung grün angefärbt, befinden sich unmittelbar oberhalb vom Zellkern der Zelle, welcher blau angefärbt wurde.

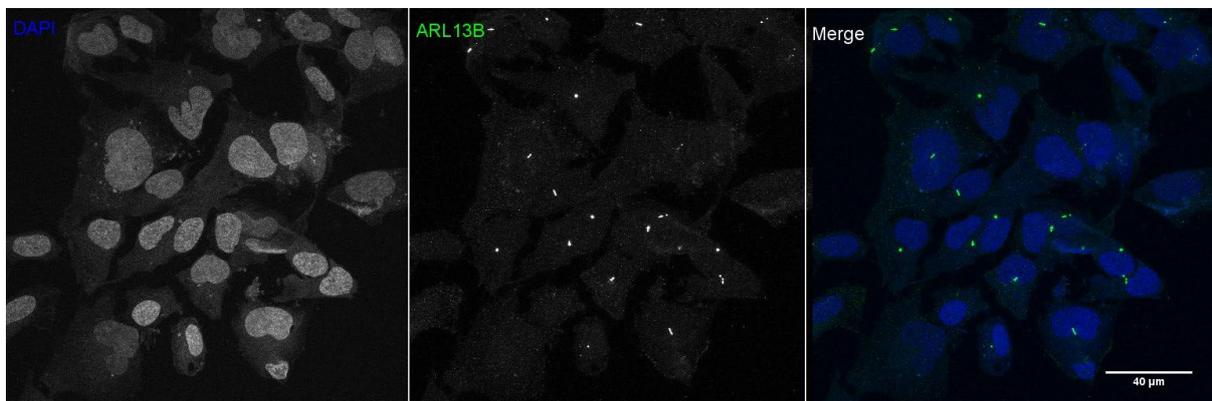


Abbildung 6: CCD_RCC-Wildtypzellen bilden primäre Zilien

Immunfluoreszenzfärbung von CCD_RCC-Wildtypzellen mit dem ziliären Marker ARL13B (grün) und dem Zellkernmarker DAPI (blau). Die Zellen wurden für 48 h einem Serumentzug ausgesetzt und anschließend gefärbt.

Eine weitere Immunfluoreszenzfärbung der CCD_RCC-Zellen wurde mit einem Antikörper gegen das zentrosomale Protein Pericentrin (rot) und den Zilienmarker ARL13B (grün) durchgeführt (Abb. 7). Erwartungsgemäß zeigt sich ein positives Zentriolenstaining an der Zilienbasis. Um das primäre Zilium zu kennzeichnen, wurde das Zilium mittels desselben ziliären Markers wie in Abbildung 6 markiert.



Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung von CCD_RCC-Wildtypzellen mit einem ziliären und einem zentrosomalen Markerprotein

Immunfluoreszenzfärbung von CCD_RCC-Wildtypzellen mit dem ziliären Marker ARL13B (grün) und dem zentrosomalen Marker Pericentrin (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Zellen wurden für 48 h einem Serumentzug ausgesetzt und anschließend gefärbt.

Im Folgenden wurde die Eignung der Zellen zur transienten Transfektion von Fremd-DNA mittels verschiedener Methoden untersucht, um ein geeignetes Protokoll zur Etablierung einer stabilen Zelllinie mit CCD_RCC-Zellen auszuwählen. Hierbei konnte anhand der Transfektion eines GFP-Plasmids in die Zellen gezeigt werden, dass die Transfektion mit GeneJuice Transfektionsreagenz am erfolgreichsten war und zu einer Transfektionseffizienz von geschätzt 60% - 80% führte (Abb. 8).

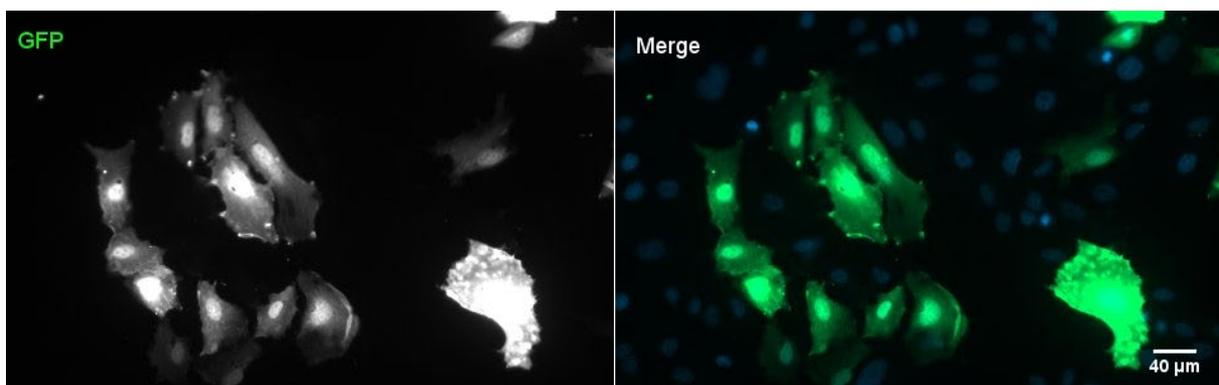


Abbildung 8: GFP-Expression von CCD_RCC-Wildtypzellen nach Transfektion mit GeneJuice Reagenz

In CCD_RCC-Wildtypzellen wurde ein GFP-Plasmid mit GeneJuice Reagenz transfiziert und unter Immunfluoreszenz betrachtet. Hierbei zeigte sich eine hohe Transfektionseffizienz des GFP (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

Die CCD_RCC-Zellen wurden in Zellkulturmedium kultiviert, welches FBS und Glutamat enthält. Unter mikroskopischer Betrachtung waren die Zellen in Zellverbänden konfiguriert.

Sie besaßen einen runden, meist mittig gelegenen Zellkern und deutlich erkennbares Zellplasma. Weiterhin zeigten die Zellen eine starke Adhärenz an die Petrischale.

4.2 Genom-Editierung mittels TALENS in CCD_RCC Zellen

Aufbauend auf Arbeiten zu den CCD_RCC-Zellen war vorgesehen, mittels *Genome Editing* eine stabile CCD_RCC-Nierenzelllinie zu generieren, welche ein Gen der Nephronophthise gekoppelt an ein Flag-Tag und an APEX exprimiert. APEX sollte für *proximity labeling* des jeweiligen ziliären Kompartments genutzt werden. Hierzu wurden Targetingvektoren kloniert, die jeweils die cDNA des NPHP-Gens *NPHP3* (1-203) oder *NPHP15* (*CEP164*) gekoppelt an ein Flag-Tag oder and APEX2 beinhalteten. Ausgangsvektor dieser Klonierungen war das TALEN-Targeting-Plasmid Msi2.3xFlag-AAVS CAG, welches bereits in anderen Experimenten des Nephrologischen Forschungslabors Verwendung fand (Abb. 9).

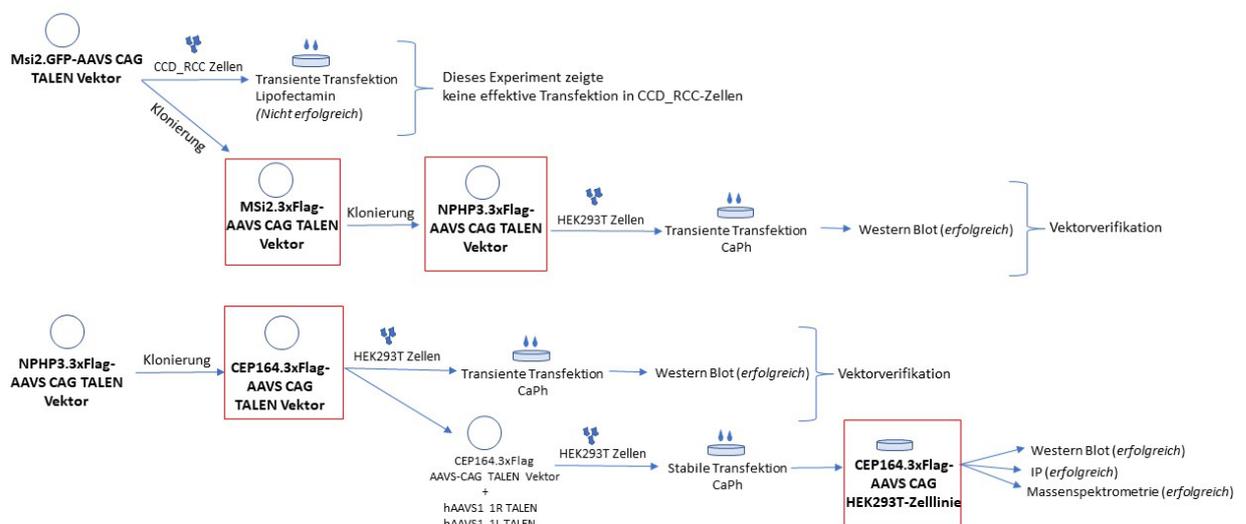


Abb. 9: Übersicht der durchgeführten Klonierungen und Zelliniengenerierungen

Darstellung der Ausgangsplasmide und durchgeführten transienten sowie stabilen Transfektionen sowie darauf aufbauende Experimente. Die rot gekennzeichneten Plasmide sowie die Zelllinie CEP164.3xFlag-AAVS CAG HEK293T wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

Trotz Bestätigung der Plasmide im Sanger Sequencing, gelang die Expression und Integration der Transgene in die CCD-RCC Zellen nicht. Die Expression von CEP164 mit dem TALEN-Vektor CEP164.3xFlag-AAVS CAG konnte in HEK293T-Zellen mittels Western

Blot verifiziert werden. Somit lag der weitere Fokus auf der Generierung einer stabilen Zelllinie, die das CEP164.3xFlag-Transgen exprimiert (Abb. 9).

Aufgrund der Schwierigkeiten der Genom-Editierung von CCD_RCC-Zellen und der nachgewiesenen Expression transient in HEK293T-Zellen wurde die weitere Zelliniengenerierung zur stabilen Expression von CEP164.3xFlag im AAVS CAG Locus mit der humanen Nierenzelllinie HEK293T fortgeführt. Diese Zellen bilden ebenfalls primäre Zilien aus, sind durch diverse Experimente bereits gut etabliert, haben schnelle Wachstumseigenschaften und eigneten sich daher zur Herstellung einer stabilen transgenen Nierenzelllinie⁵⁴. Das weitere Vorgehen zur Zelliniengenerierung wird nachfolgend erläutert.

4.3 Etablierung und Charakterisierung der CEP164.3xFlag HEK293T TALEN Zelllinie

Durch die Untersuchung des Interaktoms von NPHP15 (CEP164) sollten nun weitere mögliche Interaktionspartner dieses zentrosomalen Proteins gefunden werden. Hierzu wurde zunächst eine Zelllinie generiert, welche *NPHP15* stabil exprimiert. Dazu wurde das CEP164.3xFlag AAVS CAG-Plasmid im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Es handelt sich um einen Targeting Vektor für eine Integration in den *AAVS1*-Locus. Dieser Locus erlaubt eine stabile und damit dauerhafte Expression des Transgens⁴⁶. Da *AAVS1* nicht mit Erkrankungen vergesellschaftet ist, wird er als *safe harbour* Locus bezeichnet⁴⁶.

Nach abgeschlossener Klonierung wurde die Expression des Plasmids in HEK293T Zellen untersucht. Die Überexpression des Zielplasmids in den Zellen konnte im Western Blot mittels eines Flag-Antikörpers verifiziert werden. Hier ließ sich beim CEP164.3xFlag AAVS CAG-Vektor eine Bande auf Höhe von etwa 250 kDa für CEP164.3xFlag detektieren. Als Kontrolle wurde in dem hier durchgeführten Experiment ein CEP164.3xFlag-pcDNA6 Vektor transfiziert, welcher eine Bande auf gleicher Höhe wie bei CEP164.3xFlag zeigte. Von Graser et al. (2007) wurde bereits eine langsame Migration von NPHP15 im Western Blot beschrieben, die evtl. durch den eher sauren isoelektrischen Punkt des Proteins verursacht sein könnte. Dies sowie das Vorhandensein der Bande bei beiden Proben ließ vermuten, dass es sich bei der Bande um Cep164.3xFlag handelt (Abb. 10).

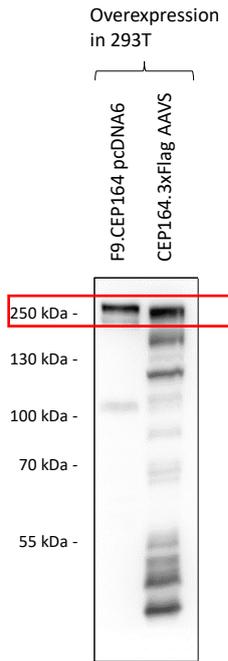
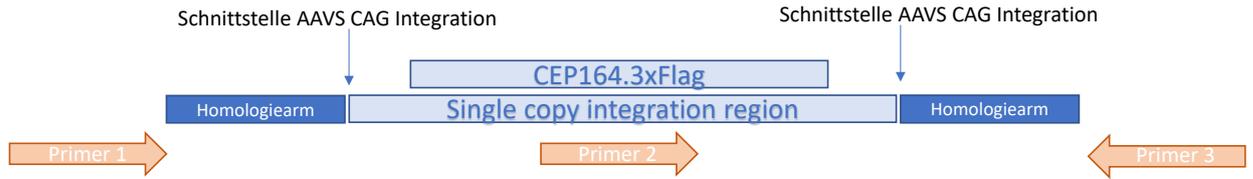


Abbildung 10: Western Blot der CEP164.3xFLAG TALEN 293T Zelllinie

Western Blot des CEP164.3xFlag AAVS CAG TALEN-Plasmids in Überexpression in HEK293T Zellen (linke Spur). Als Kontrolle wurden HEK293T-Zellen mit einem CEP164-pcDNA6 Vektor transfiziert (rechte Spur). Es wurden ein Maus anti-Flag Antikörper verwendet. Es zeigen sich bei beiden Proben eine Bande auf Höhe von CEP164.3xFlag, welche rot umrandet ist.

Nach Bestätigung der Expression des Transgens wurde der CEP164.3xFlag Targeting Vektor mit den beiden TALENs in HEK293T-Zellen mittels Calciumphosphat-Transfektion eingebracht. HEK293T-Zellen boten hier den Vorteil, dass sie leicht zu transfizieren sind und sich zur stabilen Expression von Transgenen eignen⁵⁵. Die Verifikation der Integration des CEP164.3xFlag in den AAVS CAG-Lokus der HEK293T-Zellen erfolgte durch eine Integrations-PCR (Abb. 11). Dazu wurden wie im Methodenteil dargelegt eine PCR-Reaktion mit 3 Primern durchgeführt, um eine stabile Integration des Transgens in die HEK293T-Zellen zu bestätigen (Abb. 11.a). Hier zeigte sich bei der CEP164.3xFlag AAVS CAG-Zelllinie eine einzelne Bande bei 1180 bp als Zeichen der Integration des Konstruktes in den AAVS CAG-Lokus der HEK293T-Zelllinie (Abb. 11.b). Als Kontrollen fungierten H₂O, hier war aufgrund fehlender DNA keine Bande zu erkennen, sowie HEK293T-Wildtypzellen. Die HEK293T-Wildtypzellen zeigten eine Bande auf Höhe des Wildtyps bei 1935 bp und keine Bande bei 1180 bp, da hier der AAVS CAG-Lokus leer ist.



a

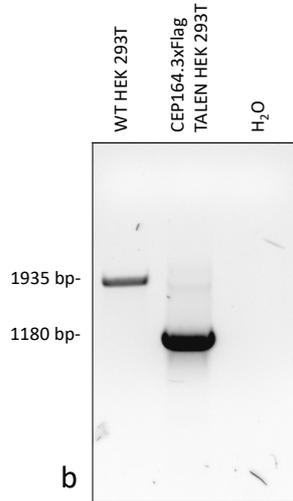


Abbildung 11: Integrations-PCR der CEP164.3xFlag AAVS CAG Zelllinie

11.a Schema der Integrations-PCR der CEP164.3xFlag AAVS CAG HEK293T-Zelllinie und Lage der Primer. Für die PCR werden die Primer 1 – 3 benötigt. Primer 1 + 2 liegen außerhalb der *Single copy integration region* und Primer 3 innerhalb der *Single copy integration region*. So entsteht bei Integration eines Transgens in den AAVS CAG Locus eine andere Bande als bei dem Wildtyp.

11.b DNA Agarose Gel der Integrations-PCR. Links die CEP164.3xFlag HEK293T Zelllinie mit einer Bande als Zeichen einer homozygoten Integration in den AAVS CAG-Lokus. Als Negativkontrollen sind HEK293T-Wildtypzellen sowie H₂O aufgetragen.

4.4 Co-Immunpräzipitation von CEP164

Mithilfe der CEP164.3xFlag AAVS CAG HEK293T-Zelllinie sollte daraufhin das Interaktom von NPHP15 untersucht werden. Zunächst wurde mit den Zellen eine Immunpräzipitation (siehe 3.2.10) durchgeführt. Als Kontrolle wurden HEK293T Wildtypzellen verwendet. Von beiden Zellreihen wurde jeweils eine 10 cm Zellkutschale verwendet. Für den IP-Western Blot wurde ein Maus anti-Flag Antikörper verwendet. Ein Teil der IP-Proben wurden ultrazentrifugiert. Die Proben vor und nach Ultrazentrifugation wurden daraufhin auf einen Western Blot aufgetragen. Auch hier wurde ein Maus anti-Flag Antikörper verwendet. Das Ergebnis der Immunpräzipitation ist in Abbildung 12.a dargestellt. Es zeigte sich bei der IP der CEP164.3xFlag AAVS CAG Zelllinie eine Bande auf derselben Höhe wie bereits zuvor beim Western Blot des CEP164.3xFlag-Plasmids in Überexpression. Das Bild des Western Blots wurde noch einmal länger belichtet, was die Banden deutlicher zum Vorschein brachte (Abb. 12.b).

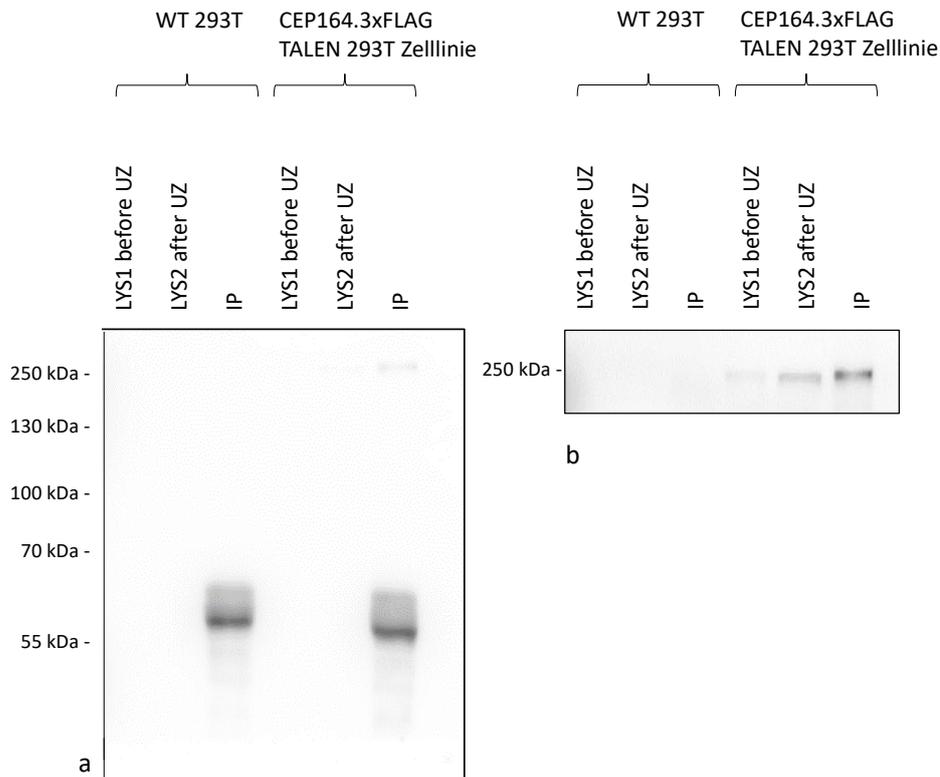


Abbildung 12: Western Blot der Immunpräzipitation der CEP164.3xFLAG AAVS CAG TALEN 293T-Zelllinie

12.a: Der rechte Teil des Blots zeigt das Ergebnis der Immunpräzipitation der CEP164.3xFlag AAVS CAG Zelllinie, der linke Teil die HEK293T- Wildtypkontrolle. Es wurde ein anti-Flag-Antikörper verwendet. Es zeigt sich bei der CEP164.3xFlag-Zelllinie eine Bande bei der IP auf Höhe von ca. 250kDa.

12.b. Dies zeigt denselben Western Blot der Immunpräzipitation nach längerer Belichtungszeit. Es zeigt sich auf Höhe des CEP164.3xFlag Konstruktes eine dünne Bande bei der CEP164.3xFlag AAVS CAG Zelllinie auf Höhe des CEP164.3xFlag Konstruktes, sowohl vor als auch nach Immunpräzipitation. Bei der Wildtypkontrolle links sind diese Banden nicht zu sehen.

Es zeigt sich, dass die Bande der CEP164.3xFlag AAVS CAG IP-Probe eine stärkere Intensität aufweist als die Banden der CEP164.3xFlag AAVS CAG Lysatproben. Hier wurde spezifisch an CEP164.3xFlag gezogen, sodass zu vermuten ist, dass der Anteil von NPHP15 am präzipitierten Proteingemisch höher ist verglichen mit dem Zelllysat. Daraufhin wurden die IP- Proben zur Erstellung eines Interaktoms in die *Proteomics Core Facility* des CECAD gegeben. Diese Versuche wurden mit drei Replikaten durchgeführt. Durch die Interaktomdaten sollte eine Aussage darüber getroffen werden, welche Proteine eine Interaktion mit NPHP15 aufweisen. Als Negativkontrolle wurden HEK293T-Wildtypzellen verwendet.

4.5 Analyse der MS/MS Daten der Co-IP von CEP164

Die Daten der Massenspektrometrie mussten zunächst in ersten Schritten vorgefiltert werden. Dazu wurden Kontaminationen sowie *reverse peptides* aus dem Datensatz entfernt, um die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse zu minimieren. Daraufhin wurde nach drei von drei Werten in mindestens einer Gruppe gefiltert und die fehlenden Werte von einer Normalverteilung imputiert. Die *Principal Component*-Analyse sowie die *Heat Map*-Analyse dienen vorwiegend als Qualitätskontrolle der durchgeführten Messungen. Ausgehend von der *Principal Component*-Analyse lässt sich die Varianz der Analyse als Maß für die Streubreite darstellen. Hier zeigte sich, dass die größte Varianz zwischen der CEP164.3xFLAG AAVS CAG TALEN 293T-Zelllinie und dem Wildtyp besteht (Abb. 13.a). Dieser Unterschied wird auch in der *Heat Map* deutlich. Die CEP164.3xFlag AAVS CAG Zelllinie unterscheidet sich in Ihrem *Clustering* sichtbar von der Wildtypkontrolle. In der *Heat Map* ist weiterhin zu sehen, dass die drei Proben der Präzipitation aus derselben Zelllinie ein ähnliches *Cluster* aufweisen (Abb. 13.b.). Dies deutet auf ein valides Messergebnis hin. Im *Volcano Plot* kann daraufhin die Signifikanz der Analyse visualisiert werden. Hierzu wurden die Daten zuvor mittels T-Test mit $S_0 = 0,2$ und einer *false discovery rate* von 0,2 selektiert und ein p-Wert von $<0,1$ als Signifikanzniveau festgesetzt. Hier ist zu erkennen, dass mehrere Proteine einen positiven *fold change* aufweisen und verstärkt bei der Präzipitation der CEP164.3xFlag-Zelllinie hinuntergezogen wurden. Das Protein, welches am stärksten in der untersuchten Zelllinie im Vergleich zum Wildtyp vertreten ist, ist erwartbarer Weise NPHP15 (Abb. 13.c).

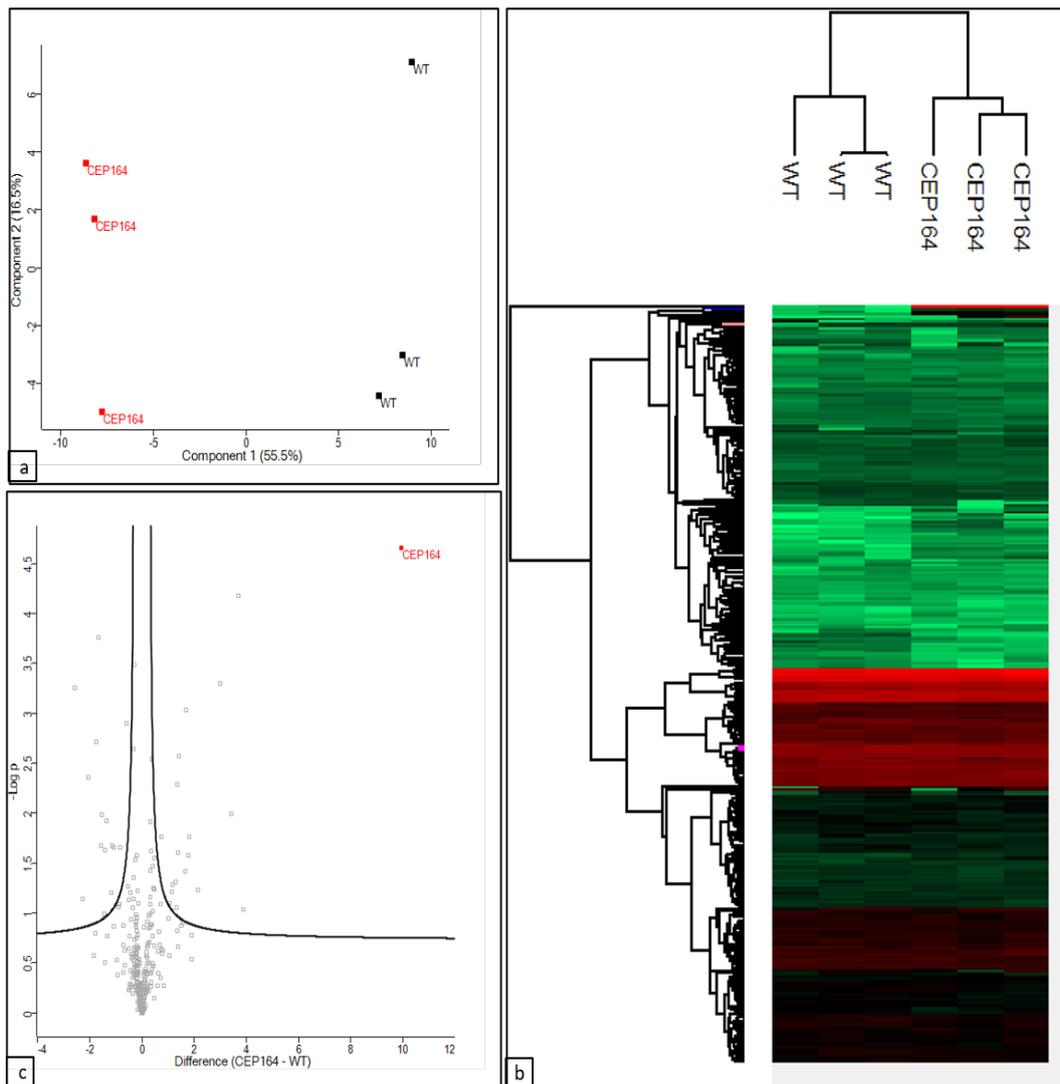


Abbildung 13: Auswertung der Interaktomanalyse

13.a: Principal component Analyse. Diese Analyse reduziert die interagierenden Proteine anhand der sich am stärksten unterscheidende Attribute des Datensatzes. Aus der Analyse wird deutlich, dass die größte Varianz des Datensatzes zwischen CEP164 und dem WT besteht.

13.b: Heat Map. Diese Abbildung stellt das *Clustering* der CEP164-Zelllinie im Gegensatz zum WT dar. Hier zeigt sich ein unterschiedliches *Clustering* der beiden Zelllinien. Zugleich clustern die 3 Proben einer Zelllinie jeweils gleich, was die Validität der Daten stützt.

13.c: Volcano Plot. Hier wird eine Aussage über die Signifikanz der in der CEP164-Zelllinie gemessenen Proteine im Vergleich zur WT-Kontrolle getroffen. Auf der x-Achse ist der *fold change* der Werte abgebildet sowie auf der y-Achse der p-Wert. Diejenigen Proteine die beim *pull down* verstärkt in der CEP164-Zelllinie mit hinuntergezogen wurden, sind rechts oberhalb des Graphen zu sehen. Darunter ist CEP164 als stärkster Interaktor zu erkennen.

Wichtig war es daraufhin, die relevanten Kandidaten aus dem Datensatz zu extrahieren. Für die Untersuchung relevant waren nur diejenigen Proteine, welche in der CEP164.3xFlag

AAVS CAG TALEN Zelllinie im Vergleich zum Wildtyp verstärkt durch den *pull down* angereichert wurden und damit einen positiven *fold change* aufwiesen. Dadurch konnte die Anzahl der Kandidaten auf 31 eingegrenzt werden. Diese sind in Tabelle 1 dargestellt.

Gen	p-Wert	Fold change (log 2)
CEP164	2,2153E-05	9,91936
SEC61A1;SEC61A2	6,6774E-05	3,68642
SLC16A1	0,00050231	3,00423
SNRPA;SNRPB2	0,00093057	1,68672
VCP	0,00266238	1,41815
ATP1A1	0,00282664	0,381721
HSP90AB2P	0,00520727	1,34921
RPL7	0,01012721	3,42359
SSR1	0,01217811	0,3207
ALDH1B1	0,01709937	0,749672
RPS27L	0,01725401	1,82371
SLC25A5	0,02393702	0,356041
OXA1L	0,02510788	1,38338
RBBP7;RBBP4	0,02664894	1,79087
TMEM33	0,02840599	0,469057
HSPA5	0,03411144	0,398178
HSPA9	0,03770683	0,324504
MT-CO3	0,03839901	1,65083
SLC3A2	0,04845516	1,28497
PLBD2	0,05181076	1,18244
SLC25A13	0,05618236	0,429626
ACADM	0,05801362	0,464715
TARDBP	0,05869215	2,13898
EIF4A3	0,06100564	1,13603
HSPH1	0,06917354	0,314913
COX4I1	0,07971499	1,04334
FMR1	0,08056938	0,723152
SLC25A3	0,08190492	0,321796
RCN2	0,08776473	1,31828
TTF2	0,09154192	3,8786
HSPA4	0,09660064	0,424969

Tabelle 1: Kandidaten der Interaktomanalyse von NPHP15

Mit der Gene Ontology Datenbank konnten die Kandidaten in verschiedenen biologischen Funktionsgruppen angereichert werden. Hier wurden sechs Annotationen gefunden. Diese können eine Aussage darüber treffen, in welchem zellulären Kompartiment die exprimierten

Proteine liegen und an welchen Prozessen sie beteiligt sein könnten. Hier zeigte sich das Zentrosom, bekannte Lokalisation des Proteins NPHP15, sowie die Membran des Endoplasmatischen Retikulums und intrazelluläre membrangebundene Organellen. Weiterhin scheinen die Kandidaten Funktionen bei DNA-Reparaturvorgängen, Proteinfaltung sowie Proteintransport ins ER zu übernehmen (Tabelle 2). Unter den Proteinen lokalisieren bekanntermaßen vier im ER, so etwa HSPA5, das an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind ⁵⁶; ⁵⁷.

Kategorie	Kategorie Wert	p-Wert
KEGG	Protein processing in endoplasmic reticulum	0,087719
GOCC	endoplasmic reticulum membrane	0,087719
GOCC	centrosome	0,087719
GOBP	protein folding	0,087719
GOBP	DNA repair	0,087719
GOCC	intracellular membrane-bounded organelle	0,067079

Tabelle 2: GO-Annotationen der NPHP15-Interaktomanalyse

Zur Einordnung der Forschungsergebnisse wurde das Interaktom der CEP164.3xFlag-AAVS CAG HEK293T Zelllinie (nachfolgend NPHP15-Interaktom genannt) mit Interaktomdaten sowie *proximity labeling*-Daten weiterer Publikationen verglichen. Zunächst wurde ein Vergleich mit Studien anderer ziliär zentrosomaler Proteine angestellt. Aydin et al. (2020) ⁵⁸ untersuchten das Protein PCM1 mittels BiOLD *Proximity Labeling* ⁵⁹. PCM1 ist ein Protein der perizentriolären Matrix. Diese Untersuchungen fanden ebenfalls in HEK293T-Zellen statt ⁵⁹. Hier konnten fünf der NPHP15-Interaktoren im Datensatz von Aydin et al. (2020) gefunden werden (Tabelle 3). Zusätzlich wurde das NPHP15-Interaktom mit proximity labeling-Daten des Proteins Aurora Kinase A, auch einem zentrosomal gelegenen ziliären Protein, aus der Publikation von Arslanhan et al. (2021) verglichen ⁵⁸. Auch hier wurde BiOLD Proximity Labeling verwendet. Hier zeigte sich SLC3A2 als gemeinsamer Kandidat zum NPHP15-Interaktom. In Tabelle 3 sind die jeweilig gemeinsamen Kandidaten zu diesen beiden Studien aufgeführt.

A	B
CEP164 (NPHP15)	SLC3A2
FMR1	
SLC16A1	
TARDBP	
TTF2	

Tabelle 3: Vergleich des NPHP15-Interaktoms mit *proximity labeling*-Studien weiterer ziliärer zentrosomaler Proteine

Auflistung gemeinsamer Kandidaten der Studien von Aydin et al. (2020) sowie Arslanhan et al. (2021) mit dem NPHP15-Interaktom. Spalte A zeigt die übereinstimmenden Kandidaten von NPHP15 und PCM1 bei Aydin et al. (2020), Spalte B zeigt diejenigen von NPHP15 und Aurora Kinase A bei Arslanhan et al. (2021).

Weiterhin wurde das NPHP15-Interaktom mit Interaktions-Daten der Datenbank BioGRID verglichen⁶⁰. Es konnten zwei schon bekannte Interaktoren von NPHP15 im hier dargestellten NPHP15-Interaktom gefunden werden. Hierbei handelt es sich um das Hitzeschockprotein HSPA9 sowie um die AAA ATPase VCP. In der Datenbank zeigen sich insgesamt 133 Interaktionspartner von NPHP15. Die 29 weiteren potentiellen Interaktoren der hier vorliegenden Analyse sind bisher nicht in Interaktomstudien zu NPHP15 gesehen worden.

Zuletzt wurde das NPHP15-Interaktom mit Proteom sowie *proximity labeling* Daten anderer Proteine verglichen, die auch als Auslöser der NPH bekannt sind. Als Datensatz wurde die Publikation von^{61 61} herangezogen. Hier wurde das Proteom der NPH-Proteine 1-5 und NPHP8 in den Nierenzelllinien RPE1 sowie IMCD3 und 3T3 untersucht. Bei RPE1 handelt es sich um eine humane Zelllinie retinaler Epithelzellen, bei IMCD3 um eine murine Nierenzelllinie aus Zellen des Sammelrohrs. 3T3-Zellen sind embryonale murine Fibroblastenzellen⁶¹. Für die 3T3-Zellen konnte keine Übereinstimmung zu den Kandidaten von NPHP15 in HEK293T-Zellen hergestellt werden. Es zeigten sich unter allen Kandidaten der untersuchten NPH-Proteine bei Sang et al. (2011) insgesamt fünf Proteine übereinstimmend mit den Kandidaten des NPHP15-Interaktoms (Tabelle 4). Diese waren teilweise in RPE1-Zellen sowie in IMCD3-Zellen zu finden. In der Tabelle 4 sind die gemeinsamen Kandidaten getrennt nach untersuchtem Protein sowie der untersuchten Zelllinie in Klammern dargestellt. RCN2 ist als einziges der Kandidaten in drei Proteomen der NPH-Proteine von Sang et al. (2011) gefunden worden.

NPHP 4	NPHP 5	NPHP 8
RCN 2 (<i>IMCD3</i>)	RCN2 (<i>RPE</i>) SLC25A3 (<i>RPE</i>) HSPA9 (<i>RPE</i>) HSPA4 (<i>IMCD3</i>)	RCN2 (<i>IMCD3</i>) HSPA5 (<i>IMCD3</i>)

Tabelle 4: Vergleich des NPHP15-Interaktoms mit dem NPHPom bei Sang et al. (2011)

Auflistung der übereinstimmenden Kandidaten des NPHP15-Interaktoms mit dem Paper von Sang et al. (2011) zum NPHP-om. Es zeigten sich Übereinstimmungen zu den 3 bei Sang et al. (2011) untersuchten Proteinen NPHP 4,5 und 8 (Spalte 1-3). In Klammern ist die Zelllinie angegeben, in denen diese Proteine gefunden wurden. Es wurden in der verglichenen Publikation die Zelllinien IMCD3, RPE1 sowie 3T3 untersucht, welche kursiv in Klammern angegeben sind.

Zuletzt wurden Daten zu NPHP3 aus der Publikation Mick et al. (2015) hinzugezogen. In dieser Publikation wurde eine IMCD3-Zelllinie untersucht, welche NPHP3 fusioniert an GFP exprimiert⁶². Hierbei wurden 162 Proteine gefunden, die sich in unmittelbarer Nähe zu NPHP3 befinden. Methodisch wurde hier die APEX2-Peroxidase zum *Proximity Labeling* eingesetzt. Es konnten 21 Kandidaten des NPHP15-Interaktoms übereinstimmend in den NPHP3 *Proximity Labeling*-Daten von Mick et al. (2015) gefunden werden (Abb. 14).

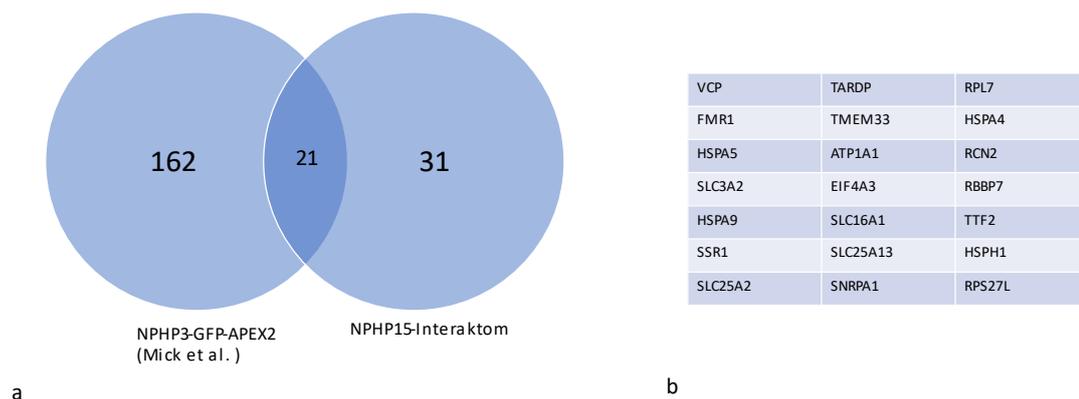


Abbildung 14: Vergleich des NPHP15-Interaktoms mit NPHP3.GFP.APEX2 Zellen bei Mick et al. (2015)

14.a. Darstellung der Schnittmenge von 21 Kandidaten des NPHP3-Datensatzes bei Mick et al. (2015) mit dem NPHP15-Interaktom, sowie Anzahl der jeweiligen Kandidaten der Untersuchungen

14.b. Auflistung der 21 übereinstimmenden Kandidaten beider Datensätze

5 Diskussion

5.1 Zellen des distalen Tubulussystems eignen sich zur Untersuchung primärer Zilien

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit CCD_RCC-Zellen konnten zeigen, dass diese humane Nierenzelllinie primäre Zilien ausbildet. Häufig befinden sich Nierenzysten, welche auf Ziliopathien zurückzuführen sind, im distalen Tubulussystem sowie im Sammelrohr⁶³. Um die Pathophysiologie von Ziliopathien an der Niere näher zu untersuchen, eignen sich daher Zellen des distalen Tubulussystems, wie die hier untersuchten CCD_RCC-Zellen.

CCD_RCC-Zellen konnten nicht für die weiteren Experimente zur Generierung einer stabilen Zelllinie verwendet werden. Die starke Reduktion der Zellzahl nach Selektion mit Puromycin deutet darauf hin, dass die Zellen die Vektor-DNA, welche eine Puromycinresistenz beinhaltet, nicht korrekt in ihr Genom integriert haben. Es kann vermutet werden, dass ein Grund für die gescheiterte Etablierung einer stabilen CCD_RCC-Zelllinie das Fehlen oder die Fehlfunktion des HDR (*homology directed repair*) Mechanismus der Zellen ist. Dieser homologe DNA-Reparaturmechanismus ist in der G2 und S-Phase des Zellzyklus aktiv und kann nach Doppelstrangbruch verwendet werden, um Fremd-DNA in die Zielzellen einzubringen⁶⁴. Für die hier verwendete TALEN Methode ist zur stabilen Integration ein HDR-Mechanismus notwendig. Fehlt dieser Mechanismus, wird der zielgerichtete Einbau von DNA-Sequenzen in die bestehende DNA deutlich schwieriger bis nahezu unmöglich⁶⁵. Ursächlich für eine Fehlfunktion des Mechanismus könnten Mutationen in HDR-Genen, wie BRCA1, sein. Um dies herauszufinden, müssten diese Gene in den CCD_RCC-Zellen auf Mutationen untersucht werden. Dies stellt jedoch einen beträchtlichen Aufwand dar.

Statt in CCD_RCC-Zellen wurde NPHP15 in HEK293T-Zellen untersucht. Diese Zellen wurden alternativ verwendet, da sie etabliert sind für die transiente als auch stabile Expression von Transgenen und die Herstellung einer großen Menge rekombinanter Proteine ermöglichen. Sie eignen sich daher gut für Zelliniengenerierung, da sie schon standardmäßig in Klonierungen und Überexpressionskontrollen verwendet werden⁵⁴. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen primäre Zilien ausbilden⁶⁶. HEK293T-Zellen sind immortalisierte humane embryonale Nierenzellen⁵⁴. Es wird angenommen dass es sich bei den Zellen um Nierenepithelzellen oder Fibroblasten handelt. Sie weisen jedoch auch Genexpressionmuster neuronaler Zellen auf, weswegen in der Forschung auch ein neuronaler Ursprung diskutiert wird⁶⁷. Sie haben weiterhin schnelle Wachstumseigenschaften sowie etablierte Kultivierungs- sowie Selektionsprotokolle⁵⁴. Bekanntermaßen besitzen diese Zellen einen HDR-Mechanismus⁶⁸. Dieser könnte mithilfe verschiedener Methoden

effizienter gestaltet werden. Zum einen könnte Zellzyklussynchronisation der Zellen oder Zellzyklusarrest in der S- oder G2-Phase zu einem verstärkten HDR-Mechanismus der Zellen führen, da dieser nur in diesen Zellzyklusphasen aktiv ist. Für dieses Verfahren konnte in Studien eine dreimal stärkere HDR-Effizienz festgestellt werden ⁶⁸. Auch das Design des verwendeten *Templates* beeinflusst die Effizienz des HDR-Mechanismus. So könnte die Verwendung eines linearen *Templates* mit homologen Flanken die HDR-Effizienz auf das bis zu 10-fache erhöhen ⁶⁹.

5.2 NPHP15 interagiert mit Proteinen des mitochondrialen Stoffwechsels

Im hier dargestellten Interaktom wurden mitochondriale Proteine gefunden, welche sich teilweise an der inneren Mitochondrienmembran befinden. Unter diesen Proteinen sind mehrere mitochondriale Transportproteine sowie EIF4A3 oder SLC25A3. SLC25A3 gehört zur Gruppe der SLC-Proteine (*solute carrier*-Proteine), welche an der Elektronentransportkette beteiligt sind und über die Atmungskette Einfluss auf die Energieproduktion der Zelle haben ⁷⁰.

Das Vorhandensein dieser Proteine, welche an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, lässt annehmen, dass sich NPHP15 auch im Mitochondrium befindet. Dies wurde in anderen Interaktomstudien von NPHP15 nicht beschrieben. Allein in einzelnen Fallstudien konnten die mitochondrialen Proteine NPHP1L und NPHP2L pathophysiologisch mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden ⁷¹. Auf Proteinebene wurde darüber hinaus bisher keine Verbindung von NPHP15 zu mitochondrialen Proteinen hergestellt. Perspektivisch wäre hier eine Lokalisationsuntersuchung mittels eines GFP-markierten Fusionsproteins oder eines fluoreszenzmarkierten CEP164-Antikörpers denkbar, um die Lokalisation des Proteins zu untersuchen. Ein weiteres im Interaktom detektiertes SLC-Protein (SLC25A5) ist ein ATP-Antiporter und über den MMXD-Komplex mit der Mitosespindel assoziiert. Dieser Proteinkomplex ist vor allem relevant für die Chromosomensegregation nach der Mitose ⁷⁰. SLC25A5 ist weiterhin involviert in die Calcium-induzierte Formation des mitochondrialen trifunktionalen Proteins (MTP), das wichtige Schritte der β -Oxidation katalysiert. MTP induziert zudem die Freisetzung von Cytochrom C in der Atmungskette. Es wird durch ATR gebildet, welches durch NPHP15 beeinflusst wird ⁷⁰. Hier wäre über die ATM/ATR-Kaskade der DNA Damage Response eine Verbindung zu Funktionen des Mitochondriums denkbar.

Darüber hinaus ist SLC3A2 im Interaktom von NPHP15 vorhanden, welches durch Aktivierung des mTOR Signalweges zu oxidativem Stress und Induktion von Autophagie führt ⁷². Eine direkte Interaktion von NPHP15 zu mTOR-Signalproteinen wurde bisher noch

nicht beschrieben. Der mTOR Signalweg ist für viele zelluläre Funktionen wichtig und ein Regulator des mitochondrialen Metabolismus⁷³. Lokalisiert sind die zugehörigen mTOR-Proteine an der inneren Mitochondrienmembran. Dort sind sie an der ATP-Produktion und an Autophagieprozessen beteiligt⁷³. Der Abbau primärer Zilien inhibiert Autophagieprozesse über mTOR Aktivierung⁷⁴. In ADPKD ist dieser Signalweg sowie die Level an cAMP, welches im Energiestoffwechsel des Mitochondriums gebraucht wird, erhöht⁷⁵. Auch bei der NPH konnte eine erhöhte mTOR-Aktivität gesehen werden⁹. Dies stützend konnten mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus oder Everolimus in Mausmodellen zu einer Verlangsamung des Zystenwachstums bei ADPKD führen⁷⁶. Ein komplettes Erliegen des Zystenwachstums wurde jedoch nicht detektiert. Auch konnten diese Ergebnisse bisher nicht auf humane Studien übertragen werden⁷⁶. Hier wäre interessant zu untersuchen, wie sich der Einsatz von mTOR-Inhibitoren in NPH-Modellen verhält. Für weitere polyzystische Nierenerkrankungen wie die ADPKD und auch für den akuten Nierenschaden ist eine mitochondriale Mitbeteiligung an der Pathophysiologie bereits beschrieben⁷⁵. So reguliert Polycystin, dessen Fehlfunktion zur Ausbildung der ADPKD führt, über verschiedene Wege mitochondriale Funktionen. Eine erhöhte Glykolyse sowie gestörte β -Oxidationsprozesse sind in Patienten mit ADPKD festgestellt worden⁷⁵. Durch den Einsatz von Glykolyseinhibitoren in Mausmodellen konnte gesehen werden, dass eine reduzierte Glykolyse mit geringerem Zystenwachstum und verbessertem Nierenvolumen assoziiert ist⁷⁷.

So könnten Strategien, die in den mitochondrialen Stoffwechsel eingreifen, sowie der Einsatz von mTOR Inhibitoren, Ansätze zukünftiger Therapien der Nephronophthie sein. Auch wäre es denkbar den positiven Effekt einer reduzierten Glykolyse, wie in ADPKD-Modellen beschrieben, auch in Modellen der Nephronophthie zu untersuchen.

5.3 NPHP15 und Autophagie

Wie eingangs erwähnt, haben ziliäre Proteine funktionell Anteil an Prozessen der Autophagie⁷⁸. Diese sind relevant für die Regulation des Auf- und Abbau des primären Ziliums und haben Einfluss auf deren Länge⁷⁸. Autophagie hat in der Zelle die Funktion Zellorganellen und Proteine zum Erhalt der zellulären Homöostase abzubauen und kann etwa durch ROS, ER-Stress oder DNA-Schäden initiiert werden⁵⁶. Autophagie assoziierte Proteine (ATG) sind am Basalkörper des Ziliums lokalisiert und transportieren über den IFT des Ziliums abzubauen Proteine zum Lysosom, wo sie degradiert werden²⁰. Autophagie hat demnach eine elementare Funktion in der Aufrechterhaltung der physiologischen Zellfunktion und in deren Regeneration. Dysregulierte Autophagieprozesse spielen in der Pathogenese von

Ziliopathien eine Rolle ⁷⁹. Eine Hemmung von Autophagieprozessen kann sich reduzierend auf das Zystenwachstum in ADPKD auswirken ⁸⁰. Auch in proximalen Tubulusepithelzellen konnte dieser Zusammenhang beobachtet werden ⁷⁸.

Anhand des Interaktoms von NPHP15 konnte eine Verbindung von NPHP15 zu VCP (*valosin-containing protein*) gefunden werden. Die Interaktion von VCP mit ziliären Proteinen wie IFT-Proteinen wurde schon vorher beschrieben ⁸¹. Auch in den Daten des *Proximity labeling* des ziliären Proteoms bei Mick et al. (2015) wurde VCP gefunden ⁶². VCP ist in seiner Funktion beteiligt an *DNA Damage Response* sowie an Ubiquitinierungsprozessen im Rahmen der Autophagie. Durch VCP werden Proteine aus der Plasmamembran gelöst, bevor sie im Proteasom degradiert werden ⁸². Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der Proteine in kleinere Fragmente zerlegt. VCP übt Einfluss auf die Ubiquitin-Ligase RNF8 aus, die mit MDC1 Chromatin-Modifikationen nach Doppelstrangbruch durchführt ⁸². Dadurch kommt es bei Fehlfunktion von VCP zu dysfunktionalem lysosomalem Abbau von Proteinen und damit gestörter Autophagie ⁸³. Auch NPHP15 beeinflusst MDC1 und übt damit Einfluss auf DNA-Reparaturprozesse nach Doppelstrangbruch und die *DNA Damage Response* aus ¹⁸. VCP ist zudem wichtig bei der Makroautophagie geschädigter Organellen und von Zellen im Nährstoffdefizit ⁸⁴. In Interaktion mit weiteren Proteinen ist VCP Bestandteil eines Komplexes, welcher den Spindelapparat-Abbau am Ende der Mitose reguliert. Bekannt ist, dass NPHP15 an der Chromosomensegregation nach der Mitose beteiligt ist, die sich dem Spindelapparatabbau anschließt. TARDP, welches in diesem Interaktom sowie bei Aydin et al. (2020) gefunden werden konnte, reguliert zudem die Expression von VCP ⁸³.

Verschiedene Studien machten deutlich, dass Autophagie und Ziliogenese sich gegenseitig beeinflussen ⁸⁵. Autophagie scheint im primären Zilium durch Serumentzug getriggert zu werden und beeinflusst die Länge des primären Ziliums ⁷⁸. Serumentzug führt in der Zelle zur Wachstumsstimulation von primären Zilien ⁸⁶. Auch die Funktion von NPHP15 an Autophagieprozessen kann durch die hier gefundenen Interaktoren untermauert werden.

5.4 Die Rolle von NPHP15 bei DNA Damage Response Vorgängen

NPHP15 ist an der ATM/ATR Signaltransduktion beteiligt und damit ein Mediatorprotein der DNA Damage Response ³¹. Bei genotoxischem Stress kann das Protein zum Zellkern relokalisieren ⁸⁷. Der Abbau von NPHP15 inhibiert dabei die Ziliogenese und reduziert stressinduzierte DNA-Reparaturvorgänge ⁸⁸. Im Regelkreis der DNA Damage Response ist NPHP15 verantwortlich für die Phosphorylierung wichtiger DNA-Reparaturproteine wie MDC1 sowie H2AX ¹⁸. MDC1 interagiert wiederum mit ATR und ATM. Eine Schlüsselrolle der DNA Damage Response nimmt der PARP (*Poly-ADP-ribose polymerase*) - Komplex ein.

Eine Aktivierung dieses Komplexes initiiert Reparaturvorgänge nach Doppelstrangbruch ¹⁸. Als Teil dieses PARP-Komplexes wurde im NPHP15-Interaktom FMR1 gefunden. Auch FMR1 phosphoryliert H2AX ⁸⁹. Eine Fehlfunktion von FMR1 kann zudem über p53-Aktivierung zu Apoptose führen ⁸⁹.

Im Interaktom vorhanden ist auch EIF4A3 (*Eukaryotic initiation factor 4A-III*), welches die Expression des PARP-Komplexes hochreguliert ⁹⁰. EIF4A3 ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase, dessen Fehlfunktion zu Zellzyklusarrest führt. Ein kompletter Verlust dieses Proteins initiiert Apoptosevorgänge ⁹⁰. Es ist anzunehmen, dass NPHP15 auch über EIF4A3 Einfluss auf den PARP-Komplex nimmt. Dieser eukaryotische Translationsfaktor konnte am Zentrosom lokalisiert werden. Es ist bekannt, dass dieses Protein mit OFD1 interagiert, welches in der DNA-Damage Response wiederum über TIP60 den PARP-Komplex beeinflusst ¹⁸. So könnte NPHP15 über EIF4A3 auch Einfluss auf OFD1 nehmen.

Pathophysiologisch kann eine fehlerhafte DNA-Damage-Response über epithelial-mesenchymale Transformation zu Fibrose führen. Hier werden Epithelzellen zu profibrotischen mesenchymalen Stammzellen umgewandelt und verlieren dabei ihre Polarität ⁹¹. Dieser Vorgang ist zumeist in der Embryogenese angesiedelt, kann jedoch pathologisch wieder reaktiviert werden. Im Falle der Nephronophthie hat dies eine Fibrose des Nierenparenchyms zur Folge ¹⁰. NPHP15 Mutationen führen über dysregulierte DNA Damage Response zur EMT sowie Apoptose und tragen somit zur Entstehung der Nierenfibrose bei ⁹².

Andere Publikationen konnten die Beeinflussung der DNA Damage Response sowie die nukleäre Lokalisation von NPHP15 jedoch nicht reproduzieren. Bei Daly et al. (2016) wurden zentrosomale und zytosomale Lokalisationen von CEP164, jedoch keine nukleären gefunden ⁹³. Auch konnte hier keine erhöhte Sensitivität auf ionisierende Strahlung in CEP164 defizitären Zellen festgestellt werden, was bei einer Funktion von CEP164 in der DNA Damage Response zu erwarten gewesen wäre ⁹⁴. Es zeigen sich also abschließend konträre Ergebnisse der aktuellen Forschung zu diesem Punkt.

5.5 Betrachtung des NPHP15-Interaktoms im Hinblick auf Ziliopathien

Das NPHP15-Interaktom zeigt im Vergleich mit anderen Interaktionsstudien ziliärer und zentrosomaler Proteine Überschneidungen der detektierten Interaktoren. Die größte Überschneidung wurde mit dem ziliären Proteom in der Publikation von Mick et al. (2015) gefunden, jedoch stehen die gefundenen Proteine nicht im Zusammenhang zu bekannten Funktionen von NPHP15 ⁶². Zunächst ist anzunehmen, dass die Lokalisation des

untersuchten Proteins innerhalb der Zelle Einfluss auf die gefundenen Interaktoren hat. Das untersuchte Protein NPHP15 besitzt keine beschriebene Lokalisation in der Zellmembran. Es zeigt daher zu den mit *proximity labeling* detektierten ziliären Proteinen von cmAPEX in der Zilienmembran bei Kohli et al. (2017) nur geringe Übereinstimmungen ⁹⁵.

Ein Teil der Publikationen, darunter Aydin et al. (2020) und Mick et al. (2015) haben APEX2 oder BioID für den *pull-down Assay* verwendet ^{59,58}. Durch dieses *proximity labeling* ist anzunehmen, dass die Gesamtanzahl der in der Umgebung detektierten Proteine, im Vergleich zu reinen IP-Untersuchungen mit einem Flag oder GFP-Tag, erhöht werden kann. Auch die verwendete Technik der MS-Untersuchung wird Einfluss auf die Ergebnisse der Interaktomanalyse haben. So wurde bei Sang et al. (2011) *Affinity purification-MS* verwendet, was die Resultate einer MS-Analyse genauer machen kann ⁶¹. Im Unterschied zu herkömmlichen LC-MS Untersuchungen, wie sie hier mit NPHP15 durchgeführt wurden, können bei *Affinity purification-MS* Verunreinigungen der Messungen durch spezifischere Substratbindung besser gefiltert werden ⁹⁶.

Nachfolgend soll der Vergleich mit anderen NPH-Proteinen betrachtet werden. Der hier gezeigte Datensatz wurde mit *proximity labeling* Untersuchungen anderer NPH-Proteine bei Sang et al. (2011) sowie Mick et al. (2015) verglichen. Im NPHP15 Interaktom wurden keine Proteine gefunden, die bereits mit Nephronophthise in Verbindung gebracht werden konnten. Dies könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass NPH-Proteine in den meisten Geweben niedrige Expressionslevel aufweisen und daher allgemein schwer zu detektieren sind ⁹⁷. Interaktionen zu weiteren NPH-Proteinen wären anzunehmen gewesen, da NPH-Proteine häufig miteinander interagieren und Komplexe an unterschiedlichen Bereichen des Ziliums bilden ⁶¹. Sang et al. (2011) konnten zeigen, dass NPH-Proteine am Inversin-Kompartiment, an der Transitionszone sowie am Basalkörper Proteinkomplexe bilden. Hier wäre zu erwarten gewesen, dass NPHP15 gemeinsame Interaktoren mit NPHP5 und NPHP6 aufweist, welche sich ebenfalls am Basalkörper befinden ⁶¹. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Betrachtet man die bekannten Lokalisationen von NPHP15, so sind diese vorwiegend der Nukleus sowie das Zytosol an den distalen Anhängseln der Zentriole ²⁸. Anhand der gezeigten Daten können Vermutungen zu weiteren Lokalisationen von NPHP15, wie etwa im Mitochondrium, angestellt werden. Bei Vergleich des NPHP15-Interaktoms mit der BioGRID Datenbank zeigten sich viele nukleäre Proteine. Hier finden sich unter den Interaktionspartnern von NPHP15 wichtige Proteine der DNA-Damage-Response wie ATR ⁶⁰. Dies stützt wiederum die Forschungsergebnisse, dass NPHP15 an nukleären Funktionen wie der DNA-Damage-Response beteiligt sein könnte.

5.6 Hypothesen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CCD_RCC-Zelllinie ziliotragend ist. Weiterhin wurde mit GeneJuice eine effektive Methode zur Transfektion von Fremd-DNA in diese Zellen dargestellt. Anhand der gescheiterten Etablierung einer stabilen Zelllinie mit CCD_RCC-Zellen, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass diese Zellen keinen funktionierenden HDR-Mechanismus besitzen. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, neue Interaktionspartner von NPHP15 zu identifizieren, um so die ziliäre Basis näher zu charakterisieren. Hier könnte perspektivisch eine erneute Zelliniengenerierung mit anderen Techniken der Genomeditoring, wie etwa CRISPR/Cas9, sowie Experimente unter optimierten Transfektionsbedingungen angestrebt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von NPHP15 an DNA Damage Response Vorgängen sowie Autophagie gestützt und das Wissen über Interaktionen dieses Proteins konnte erweitert werden. Es lässt sich mutmaßen, dass die nukleäre Funktion von NPHP15 in der DNA Damage Response eine Hauptfunktion dieses Proteins darstellt. Ziel wäre es, dieses Wissen langfristig als Ansatzpunkte für die gezielte Therapie von Ziliopathien wie der Nephronophthise zu nutzen.

Darüber hinaus konnten anhand der Interaktomdaten Hinweise für eine Lokalisation von NPHP15 im Mitochondrium gefunden werden. Hier wären weitere Untersuchungen etwa mithilfe eines spezifischen Antikörpers sinnvoll, um die zellulären Lokalisationen von NPHP15 zu verifizieren, insbesondere ein potenzielles Vorhandensein im Mitochondrium.

Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit sollen zukünftig weitere transgene Zelllinien mit Proteinen anderer ziliärer Lokalisation etabliert werden. Hier ist geplant, die Herstellung von Zelllinien mit Transgenen, die CENTRIN2, NPHP3 sowie CEP152 exprimieren, zu wiederholen. CENTRIN2 ist am Basalkörper des Ziliums, NPHP3 am proximalen Zilienanteil sowie CEP152 an der perizentriolären Matrix lokalisiert. Dadurch soll es möglich werden, ein Interaktionsnetzwerk mehrerer Baueinheiten des primären Ziliums zu schaffen. Der nächste Schritt sähe vor, stabile Zelllinien zu generieren, die diese Proteine jeweils fusioniert an die APEX2-Peroxidase exprimieren. Mithilfe von enzymkatalysiertem *Proximity Labeling* sollen so nähere Studien zum ziliären Proteom durchgeführt werden. Bisherige Studien zeigen, dass *Proximity Labeling* eine große Anzahl interagierender Proteine präzipitieren kann⁶². So könnten die Interaktomdaten von NPHP15 mit *proximity labeling*-Daten dieses Proteins ergänzt werden. Weiterhin könnten die hier gefundenen interagierenden Proteine zukünftig als Ausgangspunkte für weitere Interaktomanalysen der ziliären Basis fungieren.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1533–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1010172>.
- 2 König J, Kranz B, König S, et al. Phenotypic Spectrum of Children with Nephronophthisis and Related Ciliopathies. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; **12**: 1974–83. <https://doi.org/10.2215/CJN.01280217>.
- 3 Halvorson CR, Bremmer MS, Jacobs SC. Polycystic kidney disease: inheritance, pathophysiology, prognosis, and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2010; **3**: 69–83. <https://doi.org/10.2147/ijnrd.s6939>.
- 4 Paul BM, Vanden Heuvel GB. Kidney: polycystic kidney disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2014; **3**: 465–87. <https://doi.org/10.1002/wdev.152>.
- 5 Cornec-Le Gall E, Alam A, Perrone RD. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *The Lancet* 2019; **393**: 919–35. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32782-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32782-X).
- 6 Wang Z, Ng C, Liu X, et al. The ion channel function of polycystin-1 in the polycystin-1/polycystin-2 complex. *EMBO Rep* 2019; **20**: e48336. <https://doi.org/10.15252/embr.201948336>.
- 7 Bergmann C. ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies. *Pediatric Nephrology* 2015; **30**: 15–30. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2706-2>.
- 8 Titieni A, König J. Nephronophthise und assoziierte Ziliopathien. *medizinische genetik* 2018; **30**: 461–68. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0213-3>.
- 9 Srivastava S, Molinari E, Raman S, Sayer JA. Many Genes-One Disease? Genetics of Nephronophthisis (NPHP) and NPHP-Associated Disorders. *Front Pediatr* 2017; **5**: 287. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00287>.
- 10 Slaats GG, Ghosh AK, Falke LL, et al. Nephronophthisis-associated CEP164 regulates cell cycle progression, apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004594. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004594>.
- 11 Gupta S, Ozimek-Kulik JE, Phillips JK. Nephronophthisis-Pathobiology and Molecular Pathogenesis of a Rare Kidney Genetic Disease. *Genes (Basel)* 2021; **12**. <https://doi.org/10.3390/genes12111762>.
- 12 Wolf MTF. Nephronophthisis and related syndromes. *Curr Opin Pediatr* 2015; **27**: 201–11. <https://doi.org/10.1097/MOP.000000000000194>.
- 13 Tsang SH, Sharma T. Atlas of Inherited Retinal Disease. Springer, 2018.
- 14 Hua K, Ferland RJ. Primary cilia proteins: ciliary and extraciliary sites and functions. *Cell Mol Life Sci* 2018; **75**: 1521–40. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2740-5>.
- 15 Huang L, Lipschutz JH. Cilia and polycystic kidney disease, kith and kin. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2014; **102**: 174–85. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21066>.
- 16 Habbig S, Liebau MC. Ciliopathies - from rare inherited cystic kidney diseases to basic cellular function. *Mol Cell Pediatr* 2015; **2**: 8. <https://doi.org/10.1186/s40348-015-0019-1>.
- 17 Jain R, Javidan-Nejad C, Alexander-Brett J, et al. Sensory functions of motile cilia and implication for bronchiectasis. *Frontiers in Bioscience-Scholar* 2012; **2012**: 1088–98. <https://doi.org/10.2741/s320>.
- 18 Walz G. Role of primary cilia in non-dividing and post-mitotic cells. *Cell Tissue Res* 2017; **369**: 11–25. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2599-7>.
- 19 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**: 199–219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>.
- 20 Pampliega O, Orhon I, Patel B, et al. Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* 2013; **502**: 194–200. <https://doi.org/10.1038/nature12639>.

- 21 Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 2009; **137**: 32–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.023>.
- 22 Petra Kiesel, Gonzalo Alvarez Viar, Nikolai Tsoy, et al. The molecular structure of mammalian primary cilia revealed by cryo-electron tomography. *Nat Struct Mol Biol* 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41594-020-0507-4>.
- 23 Prevo B, Scholey JM, Peterman EJG. Intraflagellar transport: mechanisms of motor action, cooperation, and cargo delivery. *The FEBS journal* 2017; **284**: 2905–31.
<https://doi.org/10.1111/febs.14068>.
- 24 Joukov V, Nicolo A de. The Centrosome and the Primary Cilium: The Yin and Yang of a Hybrid Organelle. *Cells* 2019; **8**. <https://doi.org/10.3390/cells8070701>.
- 25 Pazour GJ. Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2528–36.
<https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141055.57643.E0>.
- 26 Lacey S, Foster H, Pigino G. The molecular structure of IFT-A and IFT-B in anterograde intraflagellar transport trains. *Nat Struct Mol Biol* 2022: 584-611.
<https://doi.org/10.1038/s41594-022-00905-5>.
- 27 Vitre B, Guesdon A, Delaval B. Non-ciliary Roles of IFT Proteins in Cell Division and Polycystic Kidney Diseases. *Front Cell Dev Biol* 2020; **2020**.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.578239>.
- 28 Čajánek L, Nigg EA. Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: E2841-50.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1401777111>.
- 29 Kobayashi T, Dynlacht BD. Regulating the transition from centriole to basal body. *J Cell Biol* 2011; **193**: 435–44. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101005>.
- 30 Pan J, Snell W. The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* 2007; **129**: 1255–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.018>.
- 31 Graser S, Stierhof Y-D, Lavoie SB, et al. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J Cell Biol* 2007; **179**: 321–30.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200707181>.
- 32 Devlin LA, Ramsbottom SA, Overman LM, et al. Embryonic and foetal expression patterns of the ciliopathy gene CEP164. *PLoS One* 2020; **15**: e0221914.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221914>.
- 33 Schmidt KN, Kuhns S, Neuner A, Hub B, Zentgraf H, Pereira G. Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *J Cell Biol* 2012; **199**: 1083–101. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202126>.
- 34 Rosa E Silva I, Binó L, Johnson CM, et al. Molecular mechanisms underlying the role of the centriolar CEP164-TTBK2 complex in ciliopathies. *Structure* 2022; **30**: 114-128.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2021.08.007>.
- 35 Sivasubramaniam S, Sun X, Pan Y-R, Wang S, Lee EY-HP. Cep164 is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of MDC1, RPA, and CHK1. *Genes Dev* 2008; **22**: 587–600. <https://doi.org/10.1101/gad.1627708>.
- 36 Silva LM, Wang W, Allard BA, Pottorf TS, Jacobs DT, Tran PV. Analysis of primary cilia in renal tissue and cells. *Methods Cell Biol* 2019; **153**: 205–29.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.04.008>.
- 37 Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2012.
<https://doi.org/10.3791/3923>.
- 38 Sigmon J, Larcom LL. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1996; **17**: 1524–27.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150171003>.

- 39 Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer* 2011; **12**: 51–58. <https://doi.org/10.1038/nrc3179>.
- 40 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 5463–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- 41 Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986: 674–79. <https://doi.org/10.1038/321674a0>.
- 42 Tucker RW, Pardee AB. Centriole Ciliation Is Related to Quiescence and DNA Synthesis in 3T3 Cells. *Cell* 1979; **1979**: 527–35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90261-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90261-7).
- 43 Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ* 2021; **9**: 1-37. <https://doi.org/10.7717/peerj.11165>.
- 44 Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 2745–52. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.8.2745>.
- 45 Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 7413–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>.
- 46 Ocegüera-Yanez F, Kim S-I, Matsumoto T, et al. Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods* 2016; **101**: 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.12.012>.
- 47 Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2011; **29**: 143–48. <https://doi.org/10.1038/nbt.1755>.
- 48 Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 2010; **186**: 757–61. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>.
- 49 Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae* 2014; **6**: 19–40.
- 50 Donaldson JG. Immunofluorescence staining. *Current protocols in cell biology* 2001; **Chapter 4**: Unit 4.3. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s00>.
- 51 O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; **250**: 4007–21.
- 52 Bonifacino JS, Gershlick DC, Dell'Angelica EC. Immunoprecipitation. *Current protocols in cell biology* 2016; **71**. <https://doi.org/10.1002/cpcb.3>.
- 53 Aebersold, Mann. Mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 2003; **2003**. <https://doi.org/10.1038/nature01511>.
- 54 Lin, Boone, Meuris, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations 2014.
- 55 Chin CL, Goh JB, Srinivasan H, et al. A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. *Sci Rep* 2019; **9**: 16768. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53391-z>.
- 56 Wang J, Lee J, Liem D, Ping P. HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. *Gene* 2017; **618**: 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.005>.
- 57 Chebotareva N, Bobkova I, Shilov E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress Chaperones* 2017; **22**: 319–43. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0790-0>.
- 58 Arslanhan MD, Rauniyar N, Yates JR, Firat-Karalar EN. Aurora Kinase A proximity map reveals centriolar satellites as regulators of its ciliary function. *EMBO Rep* 2021; **22**: e51902. <https://doi.org/10.15252/embr.202051902>.
- 59 Aydin ÖZ, Taflan SO, Gurkaslar C, Firat-Karalar EN. Acute inhibition of centriolar satellite function and positioning reveals their functions at the primary cilium. *PLoS Biol* 2020; **18**: e3000679. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000679>.

- 60 Stark C, Breitkreutz B-J, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: D535–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj109>.
- 61 Sang L, Miller JJ, Corbit KC, et al. Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* 2011; **145**: 513–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.019>.
- 62 Mick DU, Rodrigues RB, Leib RD, et al. Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Dev Cell* 2015; **35**: 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.015>.
- 63 Li Q, Wang Y, Deng W, et al. Heterogeneity of cell composition and origin identified by single-cell transcriptomics in renal cysts of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Theranostics* 2021; **11**: 10064–73. <https://doi.org/10.7150/thno.57220>.
- 64 Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2010; **44**: 113–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>.
- 65 Jasin M, Rothstein R. Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013: 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>.
- 66 Bernatik O, Paclikova P, Kotrbova A, Bryja V, Cajanek L. Primary cilia formation does not rely on WNT/ β -catenin signaling. *Front Cell Dev Biol* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.10.30.361642>.
- 67 Stepanenko AA, Dmitrenko VV. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 2015; **569**: 182–90. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>.
- 68 Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife* 2014; **3**: e04766. <https://doi.org/10.7554/eLife.04766>.
- 69 Liu M, Rehman S, Tang X, et al. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet* 2018; **9**: 691. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00691>.
- 70 Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 2004; **447**: 689–709. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1099-7>.
- 71 O'Toole JF, Liu Y, Davis EE, et al. Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *J Clin Invest* 2010; **120**: 791–802. <https://doi.org/10.1172/JCI40076>.
- 72 Digomann D, Linge A, Dubrovskaya A. SLC3A2/CD98hc, autophagy and tumor radioresistance: a link confirmed. *Autophagy* 2019; **15**: 1850–51. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1639302>.
- 73 La Cruz López KG de, Toledo Guzmán ME, Sánchez EO, García Carrancá A. mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Front Oncol* 2019; **9**: 1373. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01373>.
- 74 Boukhalfa A, Miceli C, Ávalos Y, Morel E, Dupont N. Interplay between primary cilia, ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Biochimie* 2019; **166**: 286–92. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.009>.
- 75 Padovano V, Podrini C, Boletta A, Caplan MJ. Metabolism and mitochondria in polycystic kidney disease research and therapy. *Nat Rev Nephrol* 2018; **14**: 678–87. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0051-1>.
- 76 Serra AL, Poster D, Kistler AD, et al. Sirolimus and Kidney Growth in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2010.
- 77 Rowe I, Chiaravalli M, Mannella V, et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nat Med* 2013; **19**: 488–93. <https://doi.org/10.1038/nm.3092>.
- 78 Tang C, Livingston MJ, Liu Z, Dong Z. Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol* 2020; **16**: 489–508. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0309-2>.

- 79 Peña-Oyarzun D, Rodriguez-Peña M, Burgos-Bravo F, et al. PKD2/polycystin-2 induces autophagy by forming a complex with BECN1. *Autophagy* 2021; **17**: 1714–28. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1782035>.
- 80 Lee EJ, Ko JY, Oh S, et al. Autophagy induction promotes renal cyst growth in polycystic kidney disease. *EBioMedicine* 2020; **60**: 102986. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102986>.
- 81 Raman M, Sergeev M, Garnaas M, et al. Systematic VCP-UBXD Adaptor Network Proteomics Identifies a Role for UBXN10 in Regulating Ciliogenesis. *Nat Cell Biol* 2015: 1356–69. <https://doi.org/10.1038/ncb3238>.
- 82 Acs K, Luijsterburg MS, Ackermann L, Salomons FA, Hoppe T, Dantuma NP. The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**: 1345–50. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2188>.
- 83 Ju J-S, Fuentealba RA, Miller SE, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol* 2009; **187**: 875–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908115>.
- 84 van den Boom J, Meyer H. VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* 2018; **69**: 182–94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.028>.
- 85 Ávalos Y, Peña-Oyarzun D, Budini M, Morselli E, Criollo A. New Roles of the Primary Cilium in Autophagy. *Biomed Res Int* 2017; **2017**: 4367019. <https://doi.org/10.1155/2017/4367019>.
- 86 Yamamoto Y, Mizushima N. Autophagy and Ciliogenesis. *JMA J* 2021; **4**: 207–15. <https://doi.org/10.31662/jmaj.2021-0090>.
- 87 Johnson CA, Malicki JJ. The Nuclear Arsenal of Cilia. *Dev Cell* 2019; **49**: 161–70. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.03.009>.
- 88 Chen T-Y, Huang B-M, Tang TK, et al. Genotoxic stress-activated DNA-PK-p53 cascade and autophagy cooperatively induce ciliogenesis to maintain the DNA damage response. *Cell Death Differ* 2021; **28**: 1865–79. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00713-8>.
- 89 Alpatov R, Lesch BJ, Nakamoto-Kinoshita M, et al. A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell* 2014; **157**: 869–81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.040>.
- 90 Kanellis DC, Espinoza JA, Zisi A, et al. The exon-junction complex helicase eIF4A3 controls cell fate via coordinated regulation of ribosome biogenesis and translational output. *Sci Adv* 2021; **7**. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf7561>.
- 91 Lovisa S. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Fibrosis: Concepts and Targeting Strategies. *Front Pharmacol* 2021; **12**: 737570. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.737570>.
- 92 Mansour F, Boivin FJ, Shaheed IB, Schueler M, Schmidt-Ott KM. The Role of Centrosome Distal Appendage Proteins (DAPs) in Nephronophthisis and Ciliogenesis. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms222212253>.
- 93 Daly OM, Gaboriau D, Karakaya K, et al. CEP164-null cells generated by genome editing show a ciliation defect with intact DNA repair capacity. *J Cell Sci* 2016: 1769–74.
- 94 Daly OM, Gaboriau D, Karakaya K, et al. CEP164-null cells generated by genome editing show a ciliation defect with intact DNA repair capacity. *J Cell Sci* 2016; **129**: 1769–74. <https://doi.org/10.1242/jcs.186221>.
- 95 Kohli P, Höhne M, Jüngst C, et al. The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia. *EMBO Rep* 2017; **18**: 1521–35. <https://doi.org/10.15252/embr.201643846>.
- 96 Meyer K, Selbach M. Quantitative affinity purification mass spectrometry: a versatile technology to study protein-protein interactions. *Front Genet* 2015; **6**: 237. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00237>.

97 Yakulov TA, Yasunaga T, Ramachandran H, et al. Anks3 interacts with nephronophthisis proteins and is required for normal renal development. *Kidney international* 2015; **87**: 1191–200. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.17>.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	15
Abbildung 2	16
Abbildung 3	17
Abbildung 4	31
Abbildung 5	38
Abbildung 6	43
Abbildung 7	44
Abbildung 8	44
Abbildung 9	45
Abbildung 10	47
Abbildung 11	48
Abbildung 12	49
Abbildung 13	51
Abbildung 14	55

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	52
Tabelle 2	53
Tabelle 3	54
Tabelle 4	55