

Aus dem Bereich medizinische Biochemie und Molekularbiologie,

Theoretische Medizin

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Funktionelle Charakterisierung von CEP290-assoziierten Ziliopathien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Andreas Riske

geb. am: 18.09.1990 in Mühlacker

Tag der Promotion: 9. Dezember 2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Jun.-Prof. Dr. David Mick
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	15
1. Zusammenfassung	16
2. Einleitung	18
2.1. Das Zilium	18
2.1.1. Einordnung und Historie	18
2.1.2. Die ziliäre Basis und die Ultrastruktur des Axonems	18
2.1.3. Die Transitions-Zone	20
2.1.4. Der Schaft und die Spitze	21
2.1.5. Funktion motiler Zilien	21
2.1.6. Funktion primärer Zilien	22
2.2. Ziliopathien	22
2.2.1. Begriffserklärung	22
2.2.2. Epidemiologie	23
2.2.3. Ziliopathien als multisymptomale Erkrankungen	23
2.2.4. Ziliopathien motiler Zilien	24
2.2.5. Ziliopathien primärer Zilien	25
2.2.5.1. Niere	25
2.2.5.2. ZNS	26
2.2.5.3. Auge	26
2.3. CEP290 und assoziierte Ziliopathien	27
2.3.1. Die zentrale Rolle von CEP290 bei Ziliopathien	27
2.3.2. Aufbau und Funktion von CEP290	28
2.3.3. Interaktionen von CEP290 mit PCM-1 und anderen Proteinen	30
2.3.4. CEP290-assoziierte Ziliopathien	31
2.4. Vorläufige Daten aus der Untersuchung einer <i>Cep290</i> ^{-/-} -IMCD3-Zelllinie	32
2.5. Zielsetzung der Arbeit	33

3. Material & Methoden	35
3.1. Material.....	35
3.1.1. Zelllinien und Bakterienstamm	35
3.1.2. Antikörper.....	37
3.1.3. Kits.....	39
3.1.4. Chemikalien	39
3.1.5. Geräte und Verbrauchsmittel.....	42
3.1.6. Software.....	45
3.1.7. Kulturmedien und Puffer.....	45
3.1.8. Plasmide	50
3.1.9. Enzyme	52
3.1.10. Oligonukleotide.....	53
3.2. Methoden.....	55
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	55
3.2.1.1. Plasmidpräparation	55
3.2.1.2. Isolation genomischer DNA.....	55
3.2.1.3. Isolation von RNA	55
3.2.1.4. Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration	55
3.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	56
3.2.1.6. PCR	56
3.2.1.7. Ortsgerichtete Mutagenese	57
3.2.1.8. Sequenzierung.....	58
3.2.1.9. LR Rekombination.....	58
3.2.1.10. Restriktionsverdau.....	58
3.2.1.11. Reverse Transkription	59
3.2.1.12. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	59
3.2.2. Mikrobiologische Methoden.....	60
3.2.2.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	60
3.2.2.2. Hitzeschock-Transformation.....	61
3.2.2.3. Herstellung von bakteriellen Kryokulturen	61

3.2.3.	Zellkulturbasierte Methoden	61
3.2.3.1.	Kultivierung von Zelllinien.....	61
3.2.3.2.	Passagierung von Zellkulturen	61
3.2.3.3.	Zellzahlbestimmung einer Zellkultur mit der Neubauer-Zählkammer	62
3.2.3.4.	Transfektion zur Generierung stabiler Zelllinien.....	62
3.2.3.5.	Transiente Transfektion von Zelllinien	63
3.2.3.6.	Selektion von Klonen.....	64
3.2.3.7.	Herstellung von Kryo-Zellkulturen	64
3.2.3.8.	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	65
3.2.3.9.	Wachstums-Assay	66
3.2.3.10.	<i>Proximity Labelling</i>	66
3.2.4.	Biochemische Methoden	67
3.2.4.1.	Herstellung von Ganzzelllysaten	67
3.2.4.2.	Bradford-Assay	68
3.2.4.3.	SDS-PAGE	68
3.2.4.4.	Western Blot	69
3.2.4.5.	Streptavidin-Chromatographie.....	71
3.2.5.	Bioinformatische Methoden	72
3.2.5.1.	Quantifizierung von Proteinmengen im Western Blot.....	72
3.2.5.2.	Messung der Zilienlängen und Quantifizierung ziliärer Proteinlevel in Immunfluoreszenz-Aufnahmen.....	72
3.2.5.3.	Statistik	72
4.	Ergebnisteil	73
4.1.	Generierung und Validierung unterschiedlicher CEP290-Zelllinien.....	73
4.1.1.	Klonierung und ortsgerichtete Mutagenese von humanem <i>CEP290</i>	73
4.1.2.	Generierung stabiler Zelllinien mit den erzeugten <i>CEP290</i> -Varianten auf Basis einer <i>Cep290</i> ^{-/-} -IMCD3-Zelllinie	75
4.1.3.	Validierung der erzeugten CEP290-Klone und Bestimmung der Expressionslevel der CEP290-Varianten.....	77

4.1.3.1.	Verifizierung eines geeigneten Antikörpers zur Detektion der LAP-getagten CEP290-Varianten mittels Western Blot	77
4.1.3.2.	Validierung der erzeugten CEP290-Klone mittels des anti-hCEP290 Antikörpers und Bestimmung der Proteinlevel der CEP290-Varianten.....	81
4.1.3.3.	Validierung der erzeugten CEP290-Klone mittels anti-hCEP290 und Bestimmung der Proteinlevel der CEP290-Varianten unter Zugabe eines Proteasom-Inhibitors	84
4.1.3.4.	Validierung unspezifischer CEP290-Klone mittels Sequenzierung	87
4.1.3.5.	Bestimmung der mRNA-Expressionslevel der CEP290-Varianten mittels qPCR	90
4.2.	Charakterisierung der generierten CEP290-Zelllinien.....	92
4.2.1.	Bestimmung der Wachstumsraten der erzeugten CEP290-Zelllinien.....	92
4.2.2.	Immunfluoreszenz-basierte Bestimmung der Lokalisation der CEP290-Varianten innerhalb der Zelle und zusätzliche Verifizierung der erzeugten CEP290-Klone	95
4.3.	Quantifizierung ziliärer Level ausgewählter Kandidatenproteine in der WT-, <i>Cep290</i> ^{-/-} - und <i>Pcm-1</i> ^{-/-} -Zelllinie sowie den generierten CEP290-Zelllinien.....	100
4.3.1.1.	Fam92a1.....	101
4.3.1.2.	Ift88.....	102
4.3.1.2.1.	Immunfluoreszenz-basierte Quantifizierung.....	102
4.3.1.2.2.	<i>Proximity Labelling</i> -basierte Analyse in der WT-, <i>Cep290</i> ^{-/-} - und <i>Pcm-1</i> ^{-/-} -Zelllinie.....	104
4.3.1.3.	Arl13b	106
4.4.	Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung des CEP290-Interaktionspartners Pcm-1 in der WT- und <i>Cep290</i> ^{-/-} -Zelllinie sowie den generierten CEP290-Zelllinien	107
4.5.	Bestimmung der Zilienlängen der WT-, <i>Cep290</i> ^{-/-} - und <i>Pcm-1</i> ^{-/-} -Zelllinie sowie der generierten CEP290-Zelllinien	109
5.	Diskussion	111
5.1.	Generierung und Validierung unterschiedlicher CEP290-Zelllinien.....	111
5.2.	Charakterisierung der generierten CEP290-Zelllinien.....	116

5.2.1. Betrachtung der <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} -Zelllinie und der Vergleichs-Zelllinien.....	117
5.2.2. Betrachtung der mit Ziliopathien assoziierten CEP290-Zelllinien.....	121
5.2.2.1. CORS/SLS Modell von CEP290.....	124
5.2.2.2. BBS Modell von CEP290	126
5.2.2.3. JS Modell von CEP290	127
5.2.2.4. LCA Modell von CEP290.....	129
5.3. Ausblick	133
6. Anhang.....	134
7. Literaturverzeichnis.....	135
8. Danksagung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

AAE	AEBSF-HCl, Aprotinin, E-64
acTub	Acetyliertes Tubulin
ADPKD	Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung
AHI	<i>Abelson helper integration site 1 protein homolog</i>
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APEX	Ascorbatperoxidase (-basiertes <i>Proximity Labelling</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arl13b	<i>ADP-Ribosylation factor-like protein 13b</i>
ARPKD	Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung
AS	Aminosäuren
ATF4	<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
BB	<i>Basal body</i>
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
BBS4	<i>Bardet-Biedl syndrome 4 protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c./p.	<i>coding DNA/protein sequence</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CC2D2A	<i>Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CEP164	<i>Centrosomal protein of 164 kDa</i>
CEP290	<i>Centrosomal protein of 290 kDa</i>
<i>Cep290^{-/-}</i>	<i>Cep290-knockout</i>
CM	<i>Ciliary membrane</i>
CORS	<i>Cerebellooculorenal syndrome</i>
CP110	<i>Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CT	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
FAM92A1	<i>Family With Sequence Similarity 92 Member A1</i>
FBS	Fetales Kälberserum
FRT	<i>FLP recognition target</i>
°C	Grad Celsius
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskraft
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFT	Intraflagellärer Transport
IFT88	Intraflagelläres Transportprotein 88 Homolog
IMCD	<i>inner medullary collecting duct</i>
INPP5E	Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase E
JS	Joubert-Syndrom
JSRD	<i>Joubert syndrome and related disorders</i>
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
LAP-tag	<i>Localisation and Affinity Purification tag</i>
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

μM	Mikromol
μm	Mikrometer
min	Minuten
MKS	Meckel-Gruber-Syndrom
ml	Milliliter
mM	Millimol
mosmol	Milliosmol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
norm.	Normiert
<i>Noto^{-/-}</i>	<i>Homeobox protein notochord-knockout</i>
NPHP	Nephronophthisis
NPHP5/6	Nephrocystin-5/6
p	p-Wert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCM	Perizentrioläres Material
PCM-1	Perizentrioläres Material 1
<i>Pcm-1^{-/-}</i>	<i>Pcm-1-knockout</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factors</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKA-R1α	Proteinkinase A regulatorische Untereinheit R1α
%	Prozent
PKD	Polyzystische Nierenerkrankung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RPE	Retinales Pigmentepithel

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Senior-Loken-Syndrom
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
STED	<i>Stimulated emission depletion</i>
SV40	Simian-Virus 40
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TCTN2	<i>Tectonic-2</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TF	Transitions-Fasern
TMEM216	<i>Transmembrane protein 216</i>
TMEM67	<i>Transmembrane protein 67</i>
TRIS	Tris-aminomethan
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV/VIS	Ultraviolettes Licht/ <i>Visible light</i>
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WB	Western Blot
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Aspartat	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin			

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ultrastruktur von motilen und immotilen Zilien mit Querschnitten aus der Basis, der Transitions-Zone und des Schaftes mit der Spitze.....	19
Abbildung 2: Übersicht über die betroffenen Organsysteme beim Defekt motiler und immotiler Zilien bzw. beider Zilientypen und deren pathologische Auswirkungen im menschlichen Körper.....	24
Abbildung 3: Modell der putativen Lokalisation wichtiger Proteine in der Transitions-Zone bzw. in der Region der Transitions-Fasern (TF) distal der ziliären Basis	28
Abbildung 4: Grafische Darstellung aller 112 in der Patientendatenbank CEP290base enthaltenen Mutationen in CEP290 mit Kennzeichnung der bekannten Domänen und Binderegionen von CEP290	30
Abbildung 5: Schematische Darstellung des „Sandwich“-Aufbaus beim Western Blot in <i>Wet-Blot</i> -Technik.	70
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Expressions-Vektors pEF5B/FRT/LAP-hCEP290 mit der Lokalisation der am 5'-Ende an einen LAP-tag fusionierten CEP290-Variante.....	75
Abbildung 7: Ganzzelllysate der Zelllinien WT, <i>Cep290</i> ^{-/-} , <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} und vier Klonen der <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{Q1942X} -Zelllinie wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit dem aus der AG Nachury stammenden anti-GFP Antikörper analysiert.....	78
Abbildung 8: Ganzzelllysate der Zelllinien WT+MKS1-LAP, <i>Cep290</i> ^{-/-} , <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} bzw. <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{Q1942X} Klon 1 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit gegen GFP (Roche AG) und S-tag gerichteten Antikörpern analysiert.....	79
Abbildung 9: Ganzzelllysate der Zelllinien WT+MKS1-LAP, <i>Cep290</i> ^{-/-} und <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit gegen humanes CEP290 gerichtetem Antikörper analysiert	81
Abbildung 10: Ganzzelllysate der Zelllinien WT, <i>Cep290</i> ^{-/-} sowie <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} , <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{W7C} Klon 4+5, <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{E1902X} Klon 7+10, <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{Q1942X} Klon 2+5 und <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5} Klon 1+4 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit Antikörpern gegen humanes CEP290 bzw. β-Aktin als Ladekontrolle analysiert.	82

Abbildung 11: Quantifizierung der Proteinlevel der CEP290-Varianten in den angezeigten Zelllinien, basierend auf dem in Abbildung 10 dargestellten Western Blot	84
Abbildung 12: Ganzzelllysate der Zelllinien <i>Cep290</i> ^{-/-} sowie <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} , <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{W7C} Klon 4+5, <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{E1902X} Klon 7+10, <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{Q1942X} Klon 2+5 und <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5} Klon 1+4 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit Antikörpern gegen hCEP290 und β -Aktin als Ladekontrolle analysiert	85
Abbildung 13: Quantifizierung der CEP290-Proteinlevel in der <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} -Zelllinie und den mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelten CEP290-Zelllinien mit den mutierten CEP290-Varianten (W7C, E1902X, Q1942X, L1141FfsX5), basierend auf dem in Abbildung 12 dargestellten Western Blot	87
Abbildung 14: Gelelektrophorese der PCR-basierten Amplifikation spezifischer genomischer DNA-Abschnitte in <i>hCEP290</i> zur Verifizierung unspezifischer Klone der erzeugten CEP290-Zelllinien	89
Abbildung 15: Chromatogramme der Sequenzierungen der aus der genomischen DNA der <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} -, <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{W7C} #4- und <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5} #4-Zelllinie generierten PCR-Produkte mit Darstellung der für die Validierung relevanten Regionen und den resultierenden Aminosäuresequenzen	90
Abbildung 16: Wachstumskurven der generierten CEP290-Zelllinien im Vergleich zur WT- und <i>Cep290</i> ^{-/-} -IMCD3-Zelllinie (A-D)	93
Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopie der IMCD3-Zelllinien <i>Cep290</i> ^{-/-} , <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT} und <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{W7C} #4	97
Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopie der IMCD3-Zelllinien <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{E1902X} #10, <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{Q1942X} #2 und <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5} #4	99
Abbildung 19: A: Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem Kandidatenprotein Fam92a1 in grün. B: Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten von Fam92a1 in den Zilien der untersuchten Zelllinien	102
Abbildung 20: A: Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem Kandidatenprotein Ift88 in grün. B: Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten von Ift88 in den Zilien der untersuchten Zelllinien	103

Abbildung 21: Analyse der gesamt extrahierten Proteine („Totals“) und der isolierten, ziliären Proteine („Eluate“) aus den „Cilia-APEX“-Zelllinien mit WT-, <i>Cep290</i> ^{-/-} - und <i>Pcm-1</i> ^{-/-} - Hintergrund, sowie einer als Negativkontrolle dienenden, unveränderten WT-Zelllinie mittels SDS-PAGE und Western Blot.....	105
Abbildung 22: A: Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem Kandidatenprotein Arl13b in grün. B: Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten von Arl13b in den Zilien der untersuchten Zelllinien.....	107
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Quantifizierung der Verteilung der Pcm-1-Fluoreszenzsignale innerhalb der Zelle	108
Abbildung 24: A: Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem CEP290-Interaktionspartner Pcm-1 in grün. B: Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Pcm-1 an der ziliären Basis und einer den Großteil der Zelle umfassenden Fläche um die ziliäre Basis herum in den untersuchten Zelllinien.....	109
Abbildung 25: Darstellung der durchschnittlichen Ziliumlängen der WT-, <i>Cep290</i> ^{-/-} - und <i>Pcm-1</i> ^{-/-} -Zelllinie sowie der generierten CEP290-Zelllinien	110
Abbildung 26: Wachstumskurven aller generierten CEP290-Zelllinien im Vergleich zur WT- und <i>Cep290</i> ^{-/-} -IMCD3-Zelllinie	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten und in dieser Arbeit generierten Zelllinien.....	35
Tabelle 2: Übersicht über den verwendeten Bakterienstamm.	37
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.....	37
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.	38
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Kits.....	39
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.	39
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel.....	42
Tabelle 8: Übersicht über die verwendete Software.....	45
Tabelle 9: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien und Puffer	45
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten und in dieser Arbeit generierten Plasmide	50
Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Enzyme	52
Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.....	53
Tabelle 13: Übersicht über die molekularen Massen der LAP-getaggten CEP290-Varianten	77
Tabelle 14: Übersicht über alle in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Charakterisierung der zum Vergleich dienenden WT-, <i>Cep290</i> ^{-/-} - und <i>Pcm-1</i> ^{-/-} -Zelllinie sowie aller generierten CEP290-Zelllinien mit den jeweiligen assoziierten klinischen Phänotypen	116

1. Zusammenfassung

Primäre Zilien sind konservierte Zellorganellen und in die Regulation zahlreicher Signalwege involviert, welche essentiell für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase sind [57,89]. Daher präsentieren sich genetisch bedingte ziliäre Dysfunktionen klinisch in Form mannigfaltiger Syndrom-Komplexe, welche unter dem Begriff der Ziliopathien subsumiert werden [5,72]. Bei der Pathogenese dieser heterogenen Erkrankungsgruppe nimmt das Transitions-Zonen-Protein CEP290 als wichtiger Bestandteil der ziliären Diffusionsbarriere eine Schlüsselrolle ein [7,32]. Es wurden bereits zahlreiche Mutationen in *CEP290* mit diversen Ziliopathien in Verbindung gebracht [17]. Wie die unterschiedlichen Mutationen jedoch zu den jeweiligen Symptomen führen, ist weitestgehend unbekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es genauere Erkenntnisse der molekularen Funktion von CEP290 als Komponente der ziliären Barriere zu gewinnen. Hierzu wurde eine heterogene Gruppe von vier ziliär dysfunktionalen CEP290-Mutanten generiert und validiert, welche mit den Ziliopathien *Cerebellooculorenal syndrome*/Senior-Loken-Syndrom (CORS/SLS), Bardet-Biedl-Syndrom (BBS), Joubert-Syndrom (JS) als auch der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA) assoziiert werden. Ferner wurde eine zum Vergleich dienende wildtypische CEP290-Variante exprimierende Zelllinie erzeugt. Die Charakterisierung der Zelllinien offenbarte neben signifikant eingeschränkten Wachstumsraten anscheinend deutlich divergierende Stabilitäten der unterschiedlichen CEP290-Varianten. Zudem konnte eine zumindest partielle Fehllokalisierung der CEP290-Variante in der CORS/SLS-Modell-Zelllinie sowie ein höchstwahrscheinlich auf eine vorzeitige Degradation zurückzuführendes vollständiges Fehlen der CEP290-Variante in der LCA-Modell-Zelllinie aufgedeckt werden. Analysen der ziliären Proteinkomposition der CEP290-Zelllinien deuten auf eine unterschiedlich starke Dysfunktion der ziliären Barriere hin, was insbesondere durch deutlich reduzierte Level von Arl13b sichtbar wurde. Die beobachtete Einschränkung der Ziliogenese in Form von verkürzten Zilien ist daher vermutlich hauptsächlich auf eine Fehlregulation durch das als Schlüsselspieler an der Ziliogenese beteiligte Arl13b zurückzuführen. Außerdem konnte ermittelt werden, dass der intraflagelläre Transport (IFT) von Proteinen in der JS-Modell-Zelllinie aufgrund erhöhter Ift88-Level erheblich stärker gestört sein könnte als in der BBS-Modell-Zelllinie und sich so ein erster Hinweis darauf ergibt, warum sich die beiden Ziliopathien trotz einer ähnlichen Verkürzung von CEP290 klinisch so divers präsentieren. Dahingegen scheint der unter anderem in die Ziliogenese involvierte CEP290-Interaktionspartner Pcm-1 zumindest in seiner subzellulären Verteilung nur in der JS-Modell-Zelllinie betroffen zu sein. Abschließend konnte eine essentielle Rolle von CEP290 in der Barrierefunktion der Transitions-Zone verifiziert und wichtige Hinweise zu den molekularen Ursachen der immensen Variabilität der Erkrankungsgruppe gewonnen werden.

Abstract

Functional characterisation of ciliopathies associated with CEP290

Primary cilia are conserved cell organelles and involved in the regulation of numerous pathways that are essential for the development and maintenance of cell homeostasis [57,89]. Thus, genetically-based ciliary dysfunctions are presented clinically as diverse syndrom complexes, which are referred to as ciliopathies [5,72]. CEP290 plays a key role in the pathogenesis of this heterogenous group of diseases and is an integral component of the so-called transition zone that forms the ciliary diffusion barrier and thereby separates the cilium from the rest of the cell [7,32]. Interestingly, many different mutations in *CEP290* have been associated with various ciliopathies [17], yet how these mutations in *CEP290* lead to the diverse symptoms remains unclear. The aim of this thesis was to gain insights into the molecular function of CEP290 as a central component of the ciliary barrier. To this end a heterogenic group of four ciliary dysfunctional CEP290 mutants could successfully be generated and validated, which are associated with the ciliopathies Cerebellooculorenal syndrome/Senior Loken syndrome (CORS/SLS), Bardet-Biedl syndrome (BBS), Joubert syndrome (JS) and Leber congenital amaurosis (LCA). In addition, a wild type CEP290 variant expressing cell line for comparison was made. The subsequent characterisation of the cell lines revealed significantly reduced growth rates next to apparently diverging stabilities of the different CEP290 variants. Moreover, at least a mislocalisation of the CEP290 variant could be detected in the CORS/SLS model cell line besides a complete absence of the CEP290 variant in the LCA model cell line, most likely due to instability and degradation. Analyses of the ciliary protein composition of the CEP290 cell lines showed different degrees of dysfunction of the ciliary barrier, exemplified by significantly reduced levels of the key ciliogenesis factor Arl13b. Therefore the apparent reduction in ciliogenesis as observed by reduced ciliary lengths is presumably based on a defective regulation of Arl13b. It could also be determined that intraflagellar transport (IFT) of proteins is probably more severely affected in the JS model cell line compared to the BBS model cell line due to elevated Ift88 levels. This finding gives a first clue for the clinical diversity of both ciliopathies despite of a similar truncation of CEP290 in the two models. Furthermore, the subcellular distribution of the CEP290 interaction partner Pcm-1, which is involved in the process of ciliogenesis, seems to be specifically affected in the JS model cell line. In conclusion, the presented results verify an essential role of CEP290 in the barrier function of the transition zone and provide important hints towards our understanding of the molecular pathogenesis and the immense variability of this group of diseases.

2. Einleitung

2.1. Das Zilium

2.1.1. Einordnung und Historie

Zilien sind hoch spezialisierte und konservierte Zellorganellen, welche sich ubiquitär auf nahezu allen Zelloberflächen befinden. Durch ihre essentielle Rolle bei der Entwicklung, aber auch ihre pathophysiologische Bedeutung im Rahmen der immer größer werdenden Klasse der Ziliopathien, sind sie in den letzten Jahren mehr und mehr in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt [40,72].

Im Allgemeinen lassen sich Zilien in zwei große, unterschiedliche Klassen einteilen: Motile und primäre (immotile) Zilien. Als Erstbeschreiber von motilen Zilien gilt Anton van Leeuwenhoek, der diese bereits im Jahre 1675 bei der mikroskopischen Untersuchung von Protozoen entdeckte [25]. Dahingegen wurden primäre Zilien erst am Ende des 19. Jahrhunderts von K.W. Zimmermann zunächst in der Niere und der Schilddrüse beschrieben [98].

2.1.2. Die ziliäre Basis und die Ultrastruktur des Axonems

Das Zilium ist eine vorwiegend apikale Struktur, welche sich in drei große Abschnitte unterteilen lässt, die ziliäre Basis, die Transitions-Zone und den Schaft mit der Spitze (Abbildung 1) [81]. Die ziliäre Basis am proximalen Ende besteht aus einer Mutter- und einer Tochter-Zentriole und wird von perizentriolärem Material (PCM), einer die Zentriolen umgebenden Elektronen-dichten Matrix [8], umringt. Dieser Komplex bildet das Zentrosom und nachdem in der G₁-Phase die Biogenese des Axonems aus der Mutter-Zentriole hervorgegangen ist, wird es auch als Basalkörper bezeichnet [40,89]. Das Axonem erstreckt sich durch die gesamte Transitions-Zone bis zum Anfang der Spitze des Ziliums und ist mit Transitions-Fasern und so genannten *Y-Links* an einer es umgebenden Lipiddoppelschicht befestigt. Beide ziliären Klassen, primäre und motile, weisen bezüglich ihrer axonemalen Struktur eine zentrale Anordnung neun symmetrisch angeordneter Mikrotubuli-Dubletten auf. Wie in Abbildung 1 gezeigt, unterscheidet sich die Ultrastruktur des Axonems hierbei jedoch zwischen den beiden Klassen und zeigt bei motilen Zilien in der Regel eine 9+2 Anordnung, da die Mikrotubuli-Dubletten hier noch ein innen gelegenes Paar von einzelnen Mikrotubuli umgeben. Immotile Zilien zeigen dahingegen meist eine 9+0 Anordnung, ihnen fehlt das zentral gelegene Mikrotubuli-Paar. Zudem besitzen sie keine Dynein-Arme, welche in motilen

Zilien von elementarer Bedeutung für die Bewegung sind. Eine Ausnahme stellen hierbei beispielsweise olfaktorische Zilien dar, die zwar eine axonemale 9+2 Struktur aufweisen, aber keine Dynein-Arme besitzen und somit zu den primären Zilien gezählt werden [33,40,89]. Die Mikrotubuli-Dubletten bestehen ihrerseits wiederum aus Dimeren von α - und β -Tubulin, wobei α -Tubulin *in vivo* posttranslational durch Acetylierung am Lysinrest 40 (α K40) modifiziert wird [50]. Erst kürzlich konnte die genaue Funktion dieser Acetylierung geklärt werden, welche in der Erhöhung der mechanischen Belastbarkeit von Mikrotubuli liegt [67].

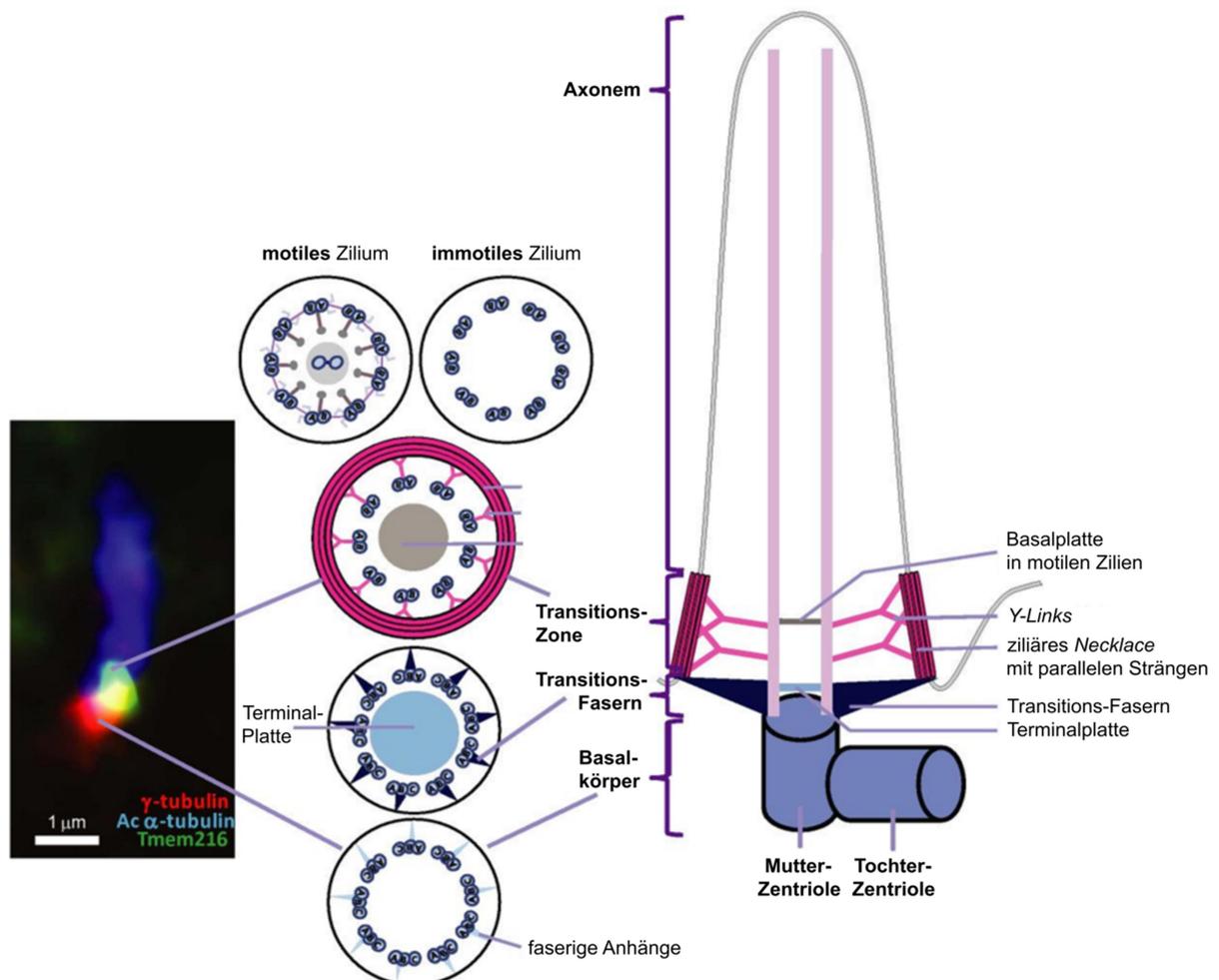


Abbildung 1: Ultrastruktur von motilen und immotilen Zilien mit Querschnitten aus der Basis, der Transitions-Zone und des Schaftes mit der Spitze. Links ist die Mikroskopieaufnahme einer Immunfluoreszenz gezeigt, bei der γ -Tubulin den Basalkörper markiert (rot), acetyliertes Tubulin (Ac α -Tubulin) das Axonem (blau) und das Transmembranprotein Tmem216 (*Transmembrane protein 216*) die Transitions-Zone (grün) (Adaptiert aus Szymanska und Johnson, 2012).

2.1.3. Die Transitions-Zone

Die Transitions-Zone ist durch die bereits im vorherigen Abschnitt genannten charakteristischen *Y-Links* gekennzeichnet und beginnt am distalen Ende des Basalkörpers (siehe Abbildung 1). An dieser Stelle befindet sich auch die ziliäre Barriere, welche sich zusätzlich aus den Transitions-Fasern und der angrenzenden Plasma- bzw. Zilienmembran zusammensetzt [32]. Als Aufgabe dieser Diffusionsbarriere wird die Steuerung des Im- und Exportes von Proteinen in das Zilium postuliert, wodurch das ziliäre Proteom entscheidend mitbestimmt wird [32,34,60]. Nichtsdestotrotz ist die genaue Funktion der Transitions-Zone noch nicht vollständig verstanden, sondern bildet vielmehr einen aktuellen Forschungsschwerpunkt. Kenntnisse über die genaue Proteinzusammensetzung in der Transitions-Zone wurden in erster Linie im Rahmen der Erforschung von Ziliopathien gewonnen. So liegt die molekulare Ursache zahlreicher ziliärer Erkrankungen in den zwei großen Proteinkomplexen der Transitions-Zone, dem NPHP (Nephronophthisis)- und dem MKS (Meckel-Gruber-Syndrom)-Komplex, denen die entsprechenden Pathologien auch gleichzeitig den Namen gaben [51]. Letzterer enthält neben *tectonic* Proteinen, B9-Domänen Proteinen sowie einer Reihe von Transmembran-Proteinen die Gruppe der *coiled-coil* Proteine, wozu auch CEP290 (*Centrosomal protein of 290 kDa*) gehört [32]. Als Schlüsselfigur stellt CEP290 einen wichtigen Akteur zwischen den beiden Proteinkomplexen der Transitions-Zone dar, indem es beispielsweise an NPHP5 (Nephrocystin-5) bindet, welches wiederum mit zwei NPHP-Komplexen assoziiert ist [32]. Ferner konnten diverse ESCRT-Proteine (*endosomal sorting complex required for transport proteins*) in der Transitions-Zone identifiziert werden, welche außerhalb von Zilien eine wichtige Rolle in der Zytokinese spielen und in Zilien wahrscheinlich eine Funktion beim intraflagellären Transport (IFT) übernehmen [32]. Darüber hinaus ist die Transitions-Zone höchstwahrscheinlich in die Ziliogenese involviert, da insbesondere Mutationen im MKS-Komplex zu gravierenden Defekten in der Ziliogenese mit äußerst heterogenen Schweregraden führen können [51]. In diesem Zusammenhang ist auch das BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs)-Domänen-Protein FAM92A1 (*Family With Sequence Similarity 92 Member A1*) von Relevanz, da gezeigt wurde, dass es womöglich ebenso eine Funktion bei der Ziliogenese innehat. Die intrazelluläre Lokalisation von FAM92A1 wird neben dem Nukleus und dem Zytoplasma daher auch an der ziliären Basis vermutet [52]. Weitere Funktionen der Transitions-Zone werden bei der Zellmorphogenese und in verschiedenen Signalwegen, wo ein kontrolliertes, dynamisches Wechselspiel der Proteine von Nöten ist, angenommen [32].

2.1.4. Der Schaft und die Spitze

Der distale Bereich des Ziliums wird als Schaft bezeichnet, welcher am distalen Ende eine Spitze besitzt, in der kein Axonem mehr verläuft. Im Schaft findet hauptsächlich der IFT entlang des zentralen Axonems statt, welcher essentiell ist, um Tubulin zur Axonemverlängerung bis zur Spitze zu befördern und so zur Aufrechterhaltung und Kontrolle der Ziliumlänge dient. Bei Defekten des IFT kommt es daher zu erheblichen Störungen bei der Bildung von Zilien und Flagellen [74]. Der IFT basiert auf Mikrotubuli-Motor abhängigem Transport von *Cargo*-Proteinen entlang des Axonems, sowohl in anterograder Richtung zur Spitze hin als auch zur Wiederverwertung der IFT-Partikel und der Motorproteine retrograd in Richtung der Basis. Der anterograde Transport wird dabei durch Kinesin, der retrograde durch Dynein vermittelt [74]. Das IFT88 Protein (Intraflagelläres Transportprotein 88 Homolog) des IFT-B Partikels ist dabei von besonderem klinischem Interesse, da IFT88 in die Pathogenese der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD) involviert ist, einer der Ziliopathien mit höherer Prävalenz (1:20.000) [74]. Darüber hinaus nimmt Arl13b (*ADP-Ribosylation factor-like protein 13B*) Einfluss auf den IFT, welches mit INPP5E (Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase E) interagiert. Zusammen regulieren sie den retrograden Transport innerhalb des Ziliums, welcher durch IFT-A Partikel vermittelt wird [63]. Daneben wird postuliert, dass Arl13b mittels seiner GTPase-Aktivität direkt mit Tubulin interagiert und dadurch zur ordnungsgemäßen Ausbildung des ziliären Axonems notwendig ist [73]. Hierbei ist bereits seit längerem bekannt, dass Mutationen in *Arl13b* klinisch zum Joubert-Syndrom führen [13].

2.1.5. Funktion motiler Zilien

Die Funktion von motilen Zilien umfasst im Menschen in erster Linie den Transport von Flüssigkeiten entlang der Zelloberfläche. Gerade im Atemwegssystem als charakteristischer Bürstensaum der respiratorischen Epithelialzellen zu finden, nehmen sie dort eine essentielle Funktion zur Reinigung und Freihaltung der Atemwege von Pathogenen und Verschmutzungen ein, der sogenannten *mucus clearance* [57]. Ebenso kleiden motile Zilien auch die Ventrikel des Zentralnervensystems zur Aufrechterhaltung des ependymalen Flusses des *Liquor cerebrospinalis* sowie die Eileiter zur Beförderung der Eizelle zum Uterus aus. Indes dienen sie als Flagellen außerdem der Fortbewegung des männlichen Pendants der Eizellen, der Spermien, im Uterus. Daneben erfüllen motile Zilien jedoch noch weitaus mehr Funktionen, vor allem im Rahmen der Embryogenese. Hierbei steuern sie zusammen mit primären Zilien die korrekte Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie des Körpers, genannt *Situs solitus* [57].

2.1.6. Funktion primärer Zilien

Demgegenüber sind primäre Zilien in die Regulation zahlreicher Signalwege involviert, welche essentiell für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase sind. Hierzu zählen der Hedgehog-Signalweg, welcher während der Embryogenese essentiell für die ordnungsgemäße Zelldifferenzierung ist, sowie der Wnt (*Wingless-related integration site*)-Signalweg, welcher hauptsächlich die Zellproliferation- und Migration steuert. Auch der PDGF (*Platelet-Derived Growth Factors*)-Signalweg wird durch primäre Zilien reguliert und ist vor allem in die Determinierung des Zellschicksals während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus in die Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen involviert [57,89]. Hierfür können immotile Zilien extrazelluläre Signale detektieren und in das Zellinnere weiterleiten, weshalb sie in ihrer Hauptfunktion derzeit als sensorische Organellen betrachtet werden, die in Form von teils hochspezialisierten Photo-, Mechano- und Osmosensoren im Körper vorkommen [57,68,89]. Als bemerkenswertes Beispiel sind hier die zur Phototransduktion optimierten äußeren Segmente der Photorezeptorzellen in der Retina zu nennen, in welche fortlaufend zur Phototransduktion benötigte Proteine IFT-basiert aus den inneren Segmenten befördert werden [89]. Ebenfalls als komplexe Osmosensoren stellen sich auch die zuvor schon erwähnten Zilien der olfaktorischen Neurone in der *Regio olfactoria* dar, mit Hilfe derer es möglich ist, zahlreiche Geruchsstoffe voneinander diskriminieren zu können [89]. In der Niere agieren primäre Zilien höchstwahrscheinlich als Sensoren der Durchflussrate, der Zusammensetzung sowie der Osmolarität des gebildeten Primär- bzw. Sekundärharns im Tubulussystem des Nephrons sowie im Sammelrohr. Somit erfüllen sie eine essentielle Funktion zur Regulation des Ionenhaushaltes im Körper, indem durch die Modulation intrazellulärer Signalwege beispielsweise die luminale Sekretion von Kalium-Ionen getriggert wird [57,68]. Trotz dessen sind die molekularen Details der Funktionsweise insbesondere primärer Zilien noch nicht hinreichend geklärt und basieren weiterhin in erster Linie auf der Untersuchung der zahlreichen Ziliopathien in unterschiedlichen Modellorganismen [89].

2.2. Ziliopathien

2.2.1. Begriffserklärung

Unter dem Begriff Ziliopathien wird eine große Gruppe von hauptsächlich Multisystem-Erkrankungen subsumiert, die auf Mutationen in ziliären Genen zurückzuführen sind und in einer Dysfunktion von primären bzw. motilen Zilien münden. Aufgrund der mannigfaltigen Funktionen von Zilien im gesamten menschlichen Körper, angefangen von der

Embryogenese bis hin zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, resultieren ziliäre Defekte in einer Vielzahl von äußerst diversen klinischen Krankheitsbildern. In den letzten Jahren ist die Anzahl der bekannten Ziliopathien rasant angestiegen und hat maßgeblich zur Aufklärung der Struktur und funktionellen Rolle von Zilien beigetragen [72,90].

2.2.2. Epidemiologie

Aus epidemiologischer Sicht zählen Ziliopathien insgesamt betrachtet zur Gruppe der seltenen Erkrankungen, wobei die Prävalenz zwischen den unterschiedlichen ziliären Erkrankungen erheblich differiert [45]. Im Folgenden soll dies exemplarisch an ausgewählten Ziliopathien veranschaulicht werden. Die bei weitem am häufigsten in der Population vorkommende Ziliopathie ist die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD), welche mit einer Prävalenz von etwa 1:1000 gleichzeitig zu den häufigsten genetischen Erkrankungen überhaupt gehört. So ist eine fortgeschrittene ADPKD in den meisten Fällen ursächlich für ein terminales Nierenversagen. Im direkten Vergleich dazu kommt die aggressiver verlaufende autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) mit einer Prävalenz von etwa 1:20.000 seltener vor. Mit einer Prävalenz von ungefähr 1:50.000 ist das MKS ein noch etwas seltener vorkommendes Krankheitsbild, was jedoch den schwersten klinischen Phänotyp zeigt. Ein weiteres sehr ernstes Krankheitsbild stellt das Joubert-Syndrom (JS) und assoziierte Erkrankungen dar, wobei die Prävalenz hier zwischen 1:30.000 und 1:100.000 liegt. Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) weist in Europa lediglich eine Prävalenz von etwa 1:150.000 auf, welche allerdings regional stark variieren und stellenweise deutlich höher liegen kann [45].

2.2.3. Ziliopathien als multisymptomale Erkrankungen

Unterschiedliche Ziliopathien zeigen ein extrem heterogenes Bild an klinischen Symptomen, die sich in der Regel in Form von ausgedehnten Syndrom-Komplexen manifestieren. Der Grund hierfür ist, dass motile bzw. immotile Zilien nahezu ubiquitär auf jeder Körperzelle vorkommen und eine Vielfalt an Funktionen im ganzen Körper besitzen [72]. Daraus resultiert bei Ziliopathien eine große Bandbreite an potentiell beteiligten Organsystemen und entsprechenden Dysfunktionen, welche in Abbildung 2 veranschaulicht und stark abhängig vom betroffenen Zilientyp sind. Hierzu zählen insbesondere polyzystische Nierenerkrankungen, aber auch Erkrankungen der Leber, der Lunge und des Pankreas, Sterilität, Amaurose, Anosmie, Hypakusis und Übergewicht. Ferner können im Rahmen von Ziliopathien kongenitale Herzfehler, Skelett- und Gesichtsanomalien, ein *Situs inversus* und

Erkrankungen des Gehirns, wie beispielsweise ein Hydrocephalus oder Epilepsie, auftreten [45,72].

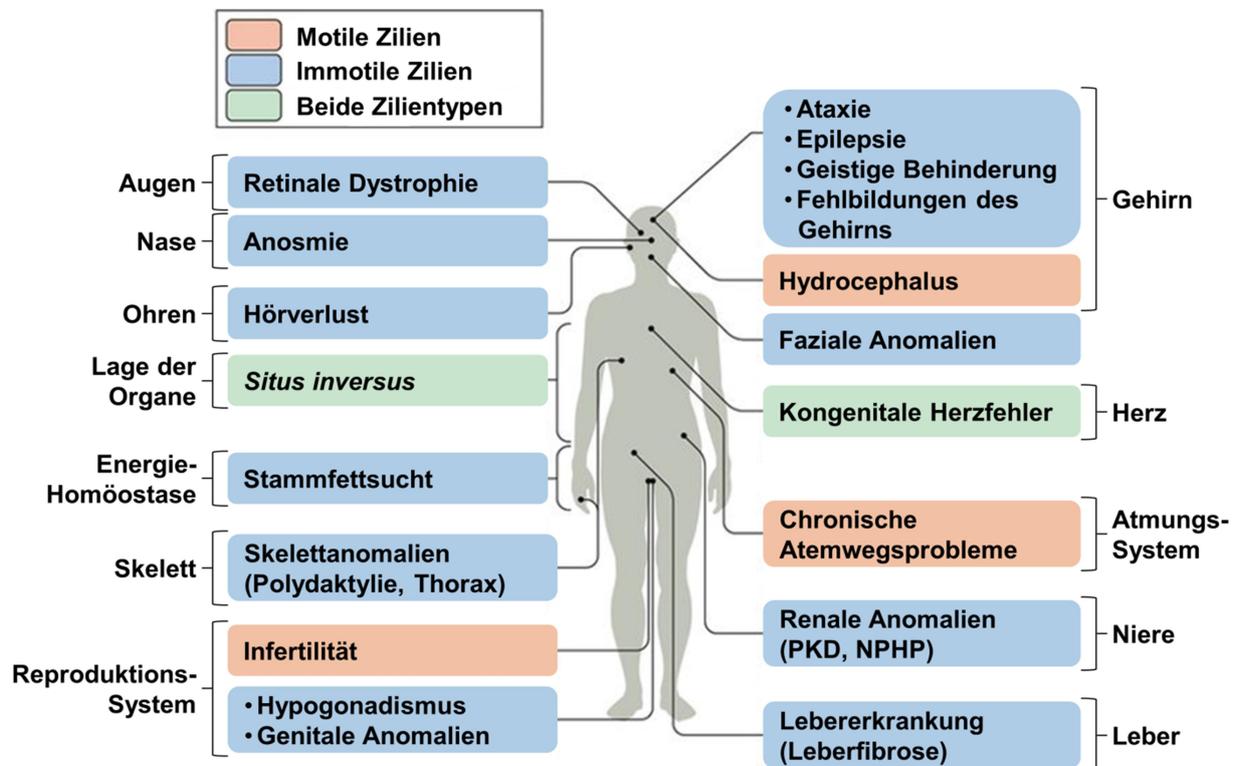


Abbildung 2: Übersicht über die betroffenen Organsysteme beim Defekt motiler (orange) und immotiler (blau) Zilien bzw. beider Zilientypen (grün) und deren pathologische Auswirkungen im menschlichen Körper. In den allermeisten Fällen resultieren aus ziliären Dysfunktionen Multisystem-Erkrankungen, die sich bereits während der embryonalen Entwicklung manifestieren können. NPHP, Nephronophthisis; PKD, polyzystische Nierenerkrankung (Adaptiert aus Reiter und Leroux, 2017).

2.2.4. Ziliopathien motiler Zilien

Die Pathogenese bei motilen Ziliopathien beruht vornehmlich auf gestörten ziliären Transportprozessen in der Lunge, dem Reproduktionssystem sowie im Gehirn [57]. In der Folge kommt es in den Atemwegen bereits neonatal zu akutem respiratorischem Distress, was auf eine beeinträchtigte *mucus clearance* zurückzuführen ist. Diese Funktionsstörung führt zu rezidivierenden Infektionen, welche mit einer Schädigung des Lungengewebes verbunden sind, und langfristig in einem terminalen Verlust der Lungenfunktion münden [57]. Daneben wird Sterilität durch einen gestörten Transport der Eizelle im Eileiter, einhergehend mit einem höheren Risiko einer Tubargravidität, bzw. einer eingeschränkten Beweglichkeit von Spermien verursacht [57]. Im Gehirn kann die Dysmotilität ependymaler Zilien zur Ausbildung eines Hydrocephalus, bedingt durch einen mangelnden Liquorabfluss, als auch

zu gravierenden Fehlbildungen des Gehirns führen [57]. Ferner kann bei motilen Ziliopathien die korrekte Bildung der Links-Rechts-Asymmetrie beeinträchtigt sein wie auch Defekte bei der Herzentwicklung auftreten [57].

2.2.5. Ziliopathien primärer Zilien

Die Pathogenese bei immotilen Zilien, welche vor allem der Signalrezeption- und Transduktion dienen und in zahlreiche Signalkaskaden involviert sind, zeigt im Vergleich zu den Ziliopathien des motilen Typs ein noch facettenreicheres Bild. Denn die Perturbation wichtiger Signalwege führt zum einen zu Defekten in der Entwicklung aber auch zu einer gestörten Zellhomöostase im adulten Organismus [57]. Im Folgenden sollen die pathophysiologischen Merkmale von sensorischen Ziliopathien anhand häufig betroffener Organsysteme genauer erörtert werden.

2.2.5.1. Niere

Eine renale Beteiligung ist bei Ziliopathien primärer Zilien außerordentlich häufig und der Zusammenhang zwischen einer aberranten ziliären Funktion und einer gestörten Zellhomöostase wurde hier als erstes postuliert [89]. Aus klinischer Sicht zeigt sich nephrologisch in erster Linie die Formation multipler Zysten, welche in vielgestaltiger Weise während der gesamten Lebensspanne entstehen und mit einer begleitenden interstitiellen Fibrose einhergehen können [57]. Hierdurch sind in besonders ausgeprägter Weise die beiden relativ häufig auftretenden polyzystischen Nierenerkrankungen ADPKD und ARPKD gekennzeichnet [89]. In diesem Zusammenhang konnte bei der ADPKD herausgefunden werden, dass die beiden betroffenen Proteine Polycystin-1 und -2 abhängig vom gemessenen Harnfluss mit Hilfe des Botenstoffs Calcium unterschiedliche intrazelluläre Signalwege modulieren können. Zu diesen zählen G-Protein-gekoppelte Signalwege, mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*), Wnt und Hedgehog [57]. Daneben treten Zystennieren aber auch bei der NPHP, dem BBS und den beiden schwerwiegendsten Ziliopathien, dem JS und dem MKS auf. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den für die infantile und juvenile Form der NPHP verantwortlichen ziliären Proteinen Nephrocystin-3 und Inversin zu Aberrationen im Wnt-Signalweg führen. Dadurch wird die Polarität der epithelialen Nierenzelle gestört, was zur Ausbildung von Zysten beiträgt [57]. Die molekulare Ursache der generellen Genese von Zysten konnte so letztendlich auf pathologische Veränderungen in den Hedgehog-, Wnt- und Notch-Signalwegen des Ziliums der renalen Epithelzellen zurückgeführt werden [85]. Dadurch kommt es intrazellulär zu aberranten Spiegeln von

Calcium und cyclischem Adenosinmonophosphat, welches wahrscheinlich für die Zystenbildung verantwortlich ist [85]. Die genaue Ursache der renalen Fibrosierung ist dahingegen noch nicht vollständig geklärt und wird derzeit in einer abnormalen DNA-Schadensantwort vermutet, die Fibroblasten in der unmittelbaren Umgebung zu einer profibrotischen Reaktion anregen [57].

2.2.5.2. ZNS

Das klinische Spektrum der Ziliopathien primärer Zilien umfasst zudem auch Beteiligungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Beispielhaft ist hier das autosomal-rezessiv vererbte JS zu nennen, welches neben einer Zystenniere als wichtigstes Merkmal eine Hypoplasie des Kleinhirnwurms aufweist, welches radiologisch als prominentes „*Molar Tooth Sign*“ im Mittelhirn sichtbar ist [61]. Zusätzlich kann auch eine Meningozele Teil des Krankheitsbildes sein. Symptomatisch leiden die Patienten vor allem an geistiger Retardierung und einer gestörten Motorik, welche sich durch Ataxie, muskuläre Hypotonie und einen Nystagmus äußert [12]. Als eine genetische Ursache des JS werden Mutationen in *AHI (Abelson helper integration site 1 protein homolog)* diskutiert, welches für das Protein Joubertin codiert, das in der Transitions-Zone lokalisiert ist [12]. Daneben konnte gezeigt werden, dass ebenso Mutationen in *CEP290* multiple Subtypen des JS verursachen können [88]. Das JS mit okulo-renalem Defekt, genannt JS Typ B oder *CORS (Cerebellooculorenal syndrome)*, stellt eine seltenere Unterform dieser Ziliopathie dar. Zusätzlich zeigt dieses Krankheitsbild eine renale Beteiligung, entweder NPHP oder eine zystische Dysplasie, sowie eine Involvierung des Auges, z.B. in Form einer retinalen Dystrophie [23]. Eine weitere, regional gehäuft vorkommende, Ziliopathie mit Beteiligung des ZNS stellt das BBS dar, welches sich unter anderem in geistiger Behinderung, Verhaltensauffälligkeiten und Übergewicht äußert [12]. Die Ursache für dieses Syndrom zeigt sich sehr heterogen, da insgesamt Mutationen in 19 Genen, darunter auch *CEP290*, entdeckt wurden. Zusammen formt ein Teil der BBS Proteine das so genannte BBSome, einen funktionellen Verband, der in den ziliären Transport involviert ist [12].

2.2.5.3. Auge

Eine schwere retinale Dystrophie ist das Hauptmerkmal der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA), welche bereits früh in den ersten Lebensjahren einsetzt und meist in einer unaufhaltsamen, isolierten Blindheit des Betroffenen mündet [24,91]. Zu den weiteren okularen Aberrationen der LCA gehören neben einem hochgradig eingeschränkten Visus

auch eine Photophobie und eine Hyperopie mit Ausbildung eines Keratokonus. Ursächlich hierfür zeigen sich abermals eine ganze Reihe von Genmutationen, die häufigsten betreffen jedoch das Gen *CEP290* [24,91]. Das Senior-Loken-Syndrom (SLS) zeigt neben einer NPHP als zweites, wesentliches klinisches Merkmal eine retinale Degeneration. Daran wird nochmal deutlich, dass sich die selben ziliären Dysfunktionen gleichzeitig in ganz unterschiedlichen Organen, in dem Fall in der Niere und im Auge, manifestieren können [5]. Das BBS zeigt als okuläre Komponente zudem eine Zapfen-Stäbchen-Dystrophie [91], ebenso wie das JS, welches darüber hinaus noch ein Kolobom des Sehnervs aufweisen kann [12].

Der Grund für die variierende Schwere und den Zeitpunkt der Manifestation der jeweiligen Ziliopathie wird dabei auf den Einfluss der spezifischen Mutation im Gen zurückgeführt [45]. Abhängig von der Mutation kann deshalb bereits die Organogenese beeinträchtigt sein und sich so eine frühe, schwere Form der Ziliopathie ausbilden, wie es beim MKS der Fall ist. Patienten mit diesem Syndrom-Komplex, welcher neben renaler Zystenformation auch erhebliche Malformationen des zentralen Nervensystem wie einer okzipitalen Enzephalozele umfassen, sind postnatal nicht länger als zirka zwei Wochen überlebensfähig [22,45]. Demgegenüber stellt das SLS, welches als ein klinisches Hauptmerkmal die NPHP zeigt, eine eher milde, später auftretende Ziliopathie dar [45].

2.3. CEP290 und assoziierte Ziliopathien

2.3.1. Die zentrale Rolle von CEP290 bei Ziliopathien

Auf genetischer Ebene sind bei Ziliopathien auffallend häufig Mutationen in Genen zu finden, welche für Proteine in der Transitions-Zone codieren [81]. Die Transitions-Zone stellt einen wesentlichen Bestandteil der ziliären Barriere dar, weswegen es infolge der Mutationen zu Defekten dieser kommt. Allerdings hat sich genau diese Diffusionsbarriere als essentiell für die Zusammensetzung der Proteinkomposition des Ziliums herauskristallisiert, indem sie den Im- und Export von Proteinen in das Zilium reguliert und somit maßgeblich die Signaltransduktion bedeutender Signalwege beeinflusst [34,60,81]. CEP290 nimmt als zentrale Komponente in der Transitions-Zone des Ziliums daher eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Ziliopathien ein [7,81]. Dies wird anhand des in Abbildung 3 gezeigten Modells der ziliären Basis und der Transitions-Zone auf Basis einer Superauflösungsmikroskopie nochmals anschaulich hervorgehoben [32,83], bei der die besondere Lage von CEP290 im Vergleich zu anderen wichtigen Transitions-Zonen-Proteinen, wie z.B. MKS1, deutlich wird. Hierbei wird angenommen, dass sich CEP290 in

zentraler Position direkt am Axonem der Transitions-Zone befindet. Dementsprechend ist es auch nicht überraschend, dass mittlerweile zahlreiche Mutationen in *CEP290* im Zusammenhang mit Ziliopathien beschrieben worden sind, welche für eine Vielzahl von äußerst diversen Krankheitsbildern ursächlich sind [17]. Der Fokus dieser Arbeit liegt daher im Besonderen auf dem Transitions-Zonen-Protein *CEP290* und auf den mit *CEP290*-assoziierten Ziliopathien, die sich im besonderen Maße dazu eignen, weitere Erkenntnisse über die Rolle des Proteins selber als auch der ziliären Transitions-Zone zu gewinnen.

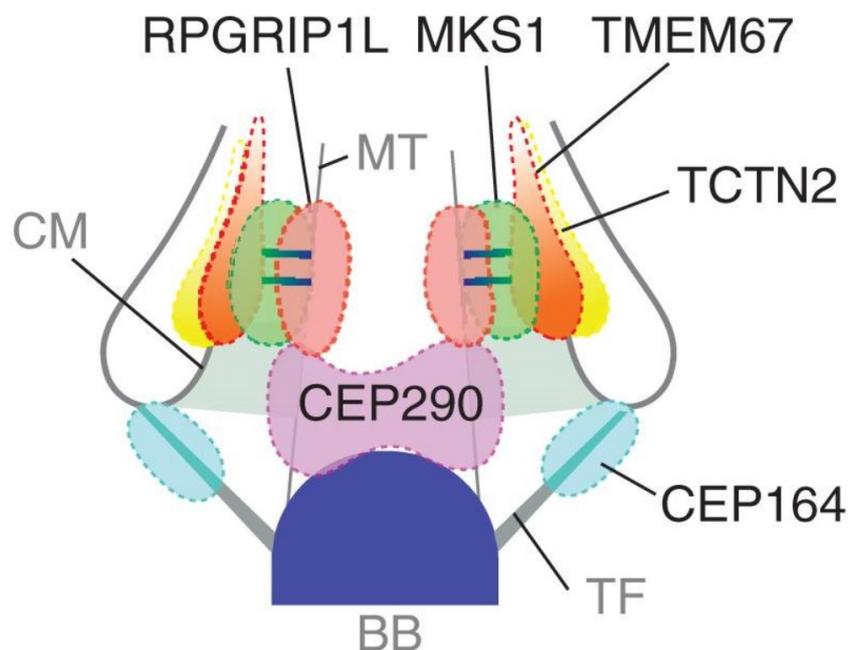


Abbildung 3: Modell der putativen Lokalisation wichtiger Proteine in der Transitions-Zone bzw. in der Region der Transitions-Fasern (TF) distal der ziliären Basis. Die vermutete Lokalisation der *Y-Links* in der Transitions-Zone wird im Modell durch die Proteine *RPGRIP1L* bzw. *MKS1* verdeckt. Die Lage von *CEP290* wird im Gegensatz zu den anderen Transitions-Zonen-Proteinen weiter proximal in direkter Nähe des Basalkörpers (BB) angenommen. Das Modell basiert auf STED (*stimulated emission depletion*)-Mikroskopie-basierten Analysen von humanen RPE (Retinales Pigmentepithel)-Zellen. *CEP164*: Mutterzentriolen-Protein; *CM*, ziliäre Membran; *MT*, Mikrotubuli; *TMEM67*, *TCTN2*, Transitions-Zonen-Proteine (Garcia-Gonzalo und Reiter, 2017, Tony Yang *et al.*, 2015).

2.3.2. Aufbau und Funktion von *CEP290*

CEP290, auch als *NPHP6* bezeichnet, stellt einen integralen Bestandteil der Transitions-Zone des Ziliums dar, wurde allerdings zunächst als Element von Zentrosomen identifiziert [88]. Zentrosomen dienen dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) einer jeden eukaryotischen Zelle als wichtiger Ausgangspunkt für die Biogenese der Mikrotubuli, womit sie bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie der Zellmotilität, Zellpolarität, der

Zellteilung sowie bei der Formation von Zilien mitwirken [88]. Daneben konnte CEP290 auch im Zellkern und bei nicht-zilierten Zellen eine weitere Lokalisation im PCM detektiert werden [77,88]. Eine Analyse der organspezifischen Expressionslevel von CEP290 in der Maus ergab dabei, dass das Protein vor allem im embryonalen Gewebe lokalisiert ist, wobei die höchste Expression im Rhombencephalon gemessen wurde [77,88].

Mit 290 kDa weist CEP290 ein außergewöhnlich hohes Molekulargewicht auf, welches sich in 2479 Aminosäuren widerspiegelt (Abbildung 4). Strukturell wurde dabei eine Serie von 13 möglichen *coiled-coil*-Domänen, eine SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*)-Homologie-Domäne, ein bipartites nukleäres Lokalisationssignal, sechs RepA/Rep+ Protein KID Motive, drei Tropomyosin-Homologie-Domänen und eine ATP/GTP-Bindestelle Motiv A identifiziert [17,77]. Daneben konnten noch mehrere Binderegionen bestimmt werden, darunter eine homo- und heterodimere Binderegion am C-Terminus des Proteins sowie Binderregionen für Rab8a, einer kleinen GTPase aus der Ras-Familie [16], CC2D2A (*Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A*), einem Interaktionspartner von CEP290 [35] sowie NPHP5 [65].

Die molekulare Funktion von CEP290 ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend geklärt und aktuelle Hypothesen basieren größtenteils auf Studien der mit CEP290-assoziierten Ziliopathien [69,89]. Einen großen Beitrag hierzu lieferte Craige *et al.* mit Untersuchungen im Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*, dessen CEP290 zur humanen Variante hochgradig homolog ist. Als Resultat dieser wurde resümiert, dass CEP290 als elementarer Teil der Transitions-Zone eine wichtige Rolle beim IFT-basierten Im- und Export von Proteinen in das Zilium spielt und so maßgeblich die ziliäre Proteinkomposition determiniert. In diesem Kontext konnten bei *CEP290*-Mutanten von *C. reinhardtii* aberrante ziliäre Proteinlevel detektiert werden, welche auch im Rahmen von Ziliopathien verändert vorliegen [18]. Des Weiteren wird es als essentiell für die ordnungsgemäße Assemblierung der Transitions-Zone erachtet, wobei in *CEP290*-Mutanten insbesondere eine drastische Reduktion der charakteristischen *Y-Links* beobachtet werden konnte, was eine mögliche Rolle des Proteins bei der Bildung dieser impliziert [18]. Zudem wurde postuliert, dass es sich bei CEP290 möglicherweise um eine dynamische Komponente handelt, die abhängig vom Zellzyklus zwischen dem Zytoplasma und der Transitions-Zone transportiert wird [18,69]. Die vermehrte Expression in embryonalem Gewebe suggeriert daneben eine wichtige Funktion von CEP290 bei der Zellteilung [88].

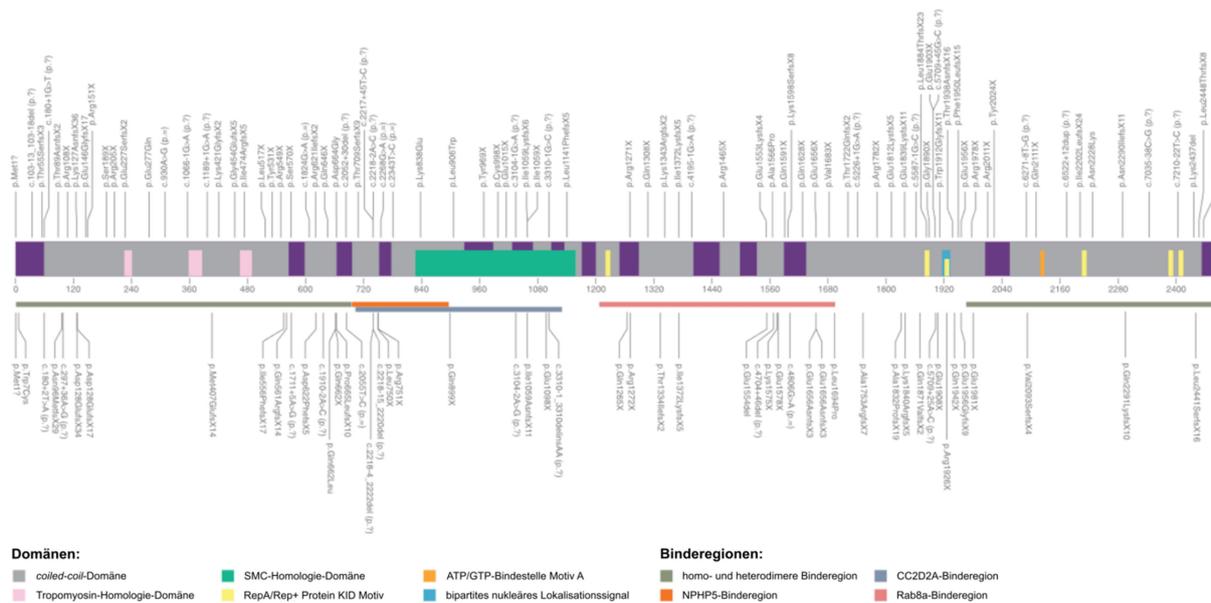


Abbildung 4: Grafische Darstellung aller 112 in der Patientendatenbank CEP290base enthaltenen Mutationen in CEP290 mit Kennzeichnung der bekannten Domänen und Binderegionen von CEP290 (farblich unterlegt). Doppelt abgebildete Mutationen beruhen auf unterschiedlichen Änderungen der Nukleotidsequenz. ATP/GTP, Adenosintriphosphat/Guanosintriphosphat; CC2D2A, *Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A*; NPHP5, Nephrocystin-5; SMC, *Structural maintenance of chromosomes* (Adaptiert aus Coppieters *et al.*, 2010).

2.3.3. Interaktionen von CEP290 mit PCM-1 und anderen Proteinen

Von einer großen Relevanz stellt sich die Interaktion von CEP290 mit dem PCM dar. Das PCM ist eine bis dato nur unvollständig charakterisierte, nicht membrangebundene, amorphe Matrix von Proteinen, welche die Zentriolen umgibt [20,92]. Der Komplex aus beidem wird auch als Zentrosom bezeichnet. Als einer der Hauptaufgaben des PCM gilt seine Rolle bei der Zellteilung, wo es die Assemblierung von Zentriolen als auch Mikrotubuli durch das MTOC (Mikrotubuli-organisierendes Zentrum) und dadurch die Ausbildung der Mitosespindel ermöglicht. Zudem scheint PCM im intrazellulären Transport involviert zu sein, indem das zur Bildung von Mikrotubuli benötigte γ -Tubulin und andere lösliche Proteine aus dem Zytoplasma an seine Matrix-Struktur binden können [20,92]. PCM-1 (Perizentrioläres Material 1) stellt einen der Hauptvertreter des perizentriolären Materials dar und kennzeichnet die so genannten zentriolären Satelliten, 70-100 nm kleine Foci, die rund um das Zentrosom herum verstreut liegen [54]. Für PCM-1 konnten mittlerweile zahlreiche Proteine assoziiert werden, die auch bei ziliären Erkrankungen betroffen sind, was womöglich auf die Beeinflussung gleicher oder miteinander interagierender Signalwege schließen lässt [54]. Einer dieser assoziierten Proteine ist das Transitions-Zonen-Protein CEP290, wobei gezeigt wurde, dass dieses direkt an PCM-1 bindet und ebenso wie PCM-1

an den zentriolären Satelliten lokalisiert ist [46]. Zudem sind sowohl CEP290 als auch PCM-1 für die korrekte Lokalisierung der GTPase Rab8 im Zilium nötig, welche in die Assemblierung der ziliären Membran involviert ist. Folglich sind beide Proteine für die Ziliogenese von Bedeutung [46]. Des Weiteren führt eine Depletion von CEP290 innerhalb der Zelle zu einer abnormalen mikrotubulären Architektur und Verteilung von PCM-1, welches infolgedessen konzentrierter um das Zentrosom herum vorliegt [46]. Die Bedeutung dieser Veränderungen ist jedoch noch unklar.

Ferner konnte gezeigt werden, dass CEP290 physisch mit dem BBSome-Komplex interagiert und die korrekte Lokalisierung von CEP290 innerhalb der Transitions-Zone sowie an die zentriolären Satelliten in Retinapigmentepithelzellen vom BBSome abhängig ist [97]. Ein direkter Aktionspartner ist darüber hinaus der Transkriptionsfaktor ATF4 (*Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4*). Dessen Aktivierung wird durch im Nukleus gelegenes CEP290 vermittelt, weshalb CEP290 auch eine nukleäre Signalsequenz besitzt. ATF4 wurde mit der cAMP-abhängigen Bildung von Zysten in der Niere in Verbindung gebracht [77]. Dahingegen stellt das zentrosomale Protein CP110 (*Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa*) einen antagonisierenden Akteur von CEP290 dar und wirkt einer im Zellzyklus zu frühzeitig stattfindenden Biogenese von Zilien entgegen [86].

2.3.4. CEP290-assoziierte Ziliopathien

In Bezug auf ziliäre Erkrankungen weist CEP290 eine außergewöhnliche Pleiotropie im menschlichen Körper auf. So wurde die molekulare Ursache vieler der autosomal rezessiv vererbten Ziliopathien auf Mutationen in *CEP290* zurückgeführt, die teils ganz unterschiedliche Organsysteme betreffen und in ihrem Schweregrad erheblich divergieren [4,88]. Als ein mit Ziliopathien assoziiertes Gen wurde es hierbei initial mit dem JS [77,88], dem verwandten SLS [37] als auch der begleitend erscheinenden NPHP [77] in Verbindung gebracht. Später folgten die LCA [24], das MKS [4], das schwerwiegendste dieser Syndrome, und schließlich das BBS [49]. Da die Anzahl der identifizierten Mutationen in *CEP290* mittlerweile die Anzahl von 100 überschritten hat, wurde eine eigene Datenbank, bei der auch die jeweiligen Phänotypen der Patienten beschrieben sind, angelegt und im Internet unter dem Namen *CEP290base* (<https://cep290base.cmgg.de>) veröffentlicht [17]. Diese Datenbank ist in Abbildung 4 grafisch dargestellt und bietet eine Übersicht über alle 112 derzeit bekannten Mutationen und ihre spezifische Lokalisation innerhalb des CEP290-Proteins. Darunter befinden sich neben einer größeren, heterozygoten Deletion, welche in einem CORS-Patienten identifiziert wurde, lediglich drei *missense*-Mutationen, die von pathologischer Relevanz sind, und 20 Mutationen, die womöglich das Spleißen verändern.

Den größten Anteil machen mit 88 beschriebenen Mutationen allerdings solche aus, die zu unterschiedlich Verkürzungen des CEP290-Proteins führen, verursacht entweder durch *nonsense*- (40) oder *frameshift*-Mutationen (48) im Gen [17]. Auf Grundlage dieser Basis erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit initial eine Selektion von Mutationen. Es wurden insgesamt vier Mutationen in *CEP290* ausgesucht, die zum einen eine möglichst große Bandbreite an assoziierten Ziliopathien im Hinblick auf betroffene Organsysteme und Schweregrad abdecken sollten und zum anderen in verschiedenen Regionen lokalisiert, respektive zu unterschiedlich Verkürzungen des Proteins führen sollten. Daraus ergab sich die Auswahl der im Folgenden aufgeführten Mutationen, angefangen mit der unmittelbar am N-Terminus gelegenen Mutation Trp7Cys, einer der wenigen in *CEP290* gefundenen *missense*-Mutationen [17]. Die Mutation betrifft dabei eine hochkonservierte Aminosäure und führt zu SLS bzw. CORS. Dadurch scheint die Proteinfunktion von CEP290 inhibiert zu werden, obgleich eine korrekte Lokalisation im Zilium validiert werden konnte [88]. Die zweite ausgewählte Mutation Leu1141PhefsX5 ist eine *frameshift*-Mutation an Aminosäure-Position 1141, welche zum Einbau eines Stoppcodons und somit zu einer massiven Verkürzung des Proteinproduktes um etwa die Hälfte führt. Dadurch würden beim reifen Protein die Rab8a-Binderegion und die homo- und heterodimeren Binderegionen sowie alle RepA/Rep+ Protein KID Motive fehlen. Allerdings wird vermutet, dass der *nonsense-mediated mRNA Decay* das aberrant eingebaute Stoppcodon in der mRNA erkennt und diese noch vor dem Start der Translation abgebaut wird. Diese Mutation zeigt als klinischen Phänotyp LCA [17]. Das BBS wird von einer dritten selektierten CEP290-Variante mit der *nonsense*-Mutation Glu1902X hervorgerufen, wobei hier anzumerken ist, dass die von Leitch *et al.* entdeckte Mutation im Originalartikel wie auch in der *CEP290base* falsch mit Glu1903X annotiert wurde [49]. Die Mutation müsste *in vivo* zur Verkürzung des Proteins um 577 Aminosäuren führen [49]. Als letzte Mutation wurde ebenfalls eine *nonsense*-Mutation ausgewählt, Gln1942X, welche interessanterweise in direkter Nähe zur ausgewählten BBS Mutation liegt, jedoch das erheblich ernstere JS auslöst [88]. Auch bei den beiden zuletzt aufgeführten Mutationen wäre es möglich, dass der *nonsense-mediated mRNA Decay* getriggert und keine verkürzten CEP290-Varianten exprimiert werden [17].

2.4. Vorläufige Daten aus der Untersuchung einer *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie

In der Arbeitsgruppe Mick wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits erste Studien zur proteomischen Analyse einer *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Mutante aus der Maus durchgeführt. Die IMCD3 (*inner medullary collecting duct*)-Zelllinie stammt aus dem inneren medullären

Sammelrohr der Niere. Die *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie wurde vorangehend in der AG Nachury (Stanford, USA) etabliert, indem ein CRISPR/Cas9-basiertes Verfahren zur gezielten Ausschaltung des *Cep290*-Gens in der *FlpIn*-IMCD3-Zelllinie angewendet wurde. Die darauffolgende Analyse des ziliären Proteoms dieser *knockout*-Zelllinie erfolgte mit Hilfe eines erst kürzlich etablierten, neuartigen, auf der Technik des *Proximity Labelling*-basierenden Verfahrens zur gezielten Isolation ziliärer Proteine [56]. Eine anschließende massenspektrometrische Analyse des aus der *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie isolierten, ziliären Proteoms lieferte eine erste Übersicht der im Vergleich zur wildtypischen IMCD3-Zelllinie veränderten ziliären Proteinlevel. Signifikant reduzierte Proteinlevel konnten dabei unter anderem bei dem an der Ziliogenese beteiligten Arl13b und dem BAR-Domänen-Protein Fam92a1 ermittelt werden. Daneben konnte eine geringere Depletion der IFT-Komponente Ift88 detektiert werden, welches in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie um etwa 30% reduziert im Vergleich zum Wildtyp vorlag (Daten noch unveröffentlicht). Diese vorläufigen Ergebnisse implizieren eine potentielle Wechselwirkung der betroffenen Proteine mit CEP290, welche im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet werden soll.

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziliopathien stellen eine gerade in den letzten Jahren rasant gewachsene Gruppe von Erkrankungen dar, welche durch genetisch bedingte ziliäre Dysfunktionen charakterisiert sind und sich klinisch in Form mannigfaltiger Syndrom-Komplexe präsentieren [5,72]. Ursächlich für diese zumeist nur symptomatisch therapierbaren Erkrankungen zeigen sich hierbei insbesondere Mutationen in Genen, welche für Proteine codieren, die direkt in der Transitions-Zone des Ziliums lokalisiert oder stark mit dieser assoziiert werden [81]. Funktionell wurde die Transitions-Zone bereits als wichtige Komponente einer ziliären Diffusionsbarriere identifiziert, die essentiell für eine Vielzahl von insbesondere in der Entwicklung wichtigen Signalwegen ist [32,34,60]. Die genaue Funktion ist bisher jedoch noch ungeklärt. Als integrales Protein der Transitions-Zone nimmt CEP290 in diesem Kontext eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Ziliopathien ein [7,32], da zahlreiche Mutationen in CEP290 mit ziliären Dysfunktionen in Verbindung gebracht wurden [17]. Hierbei weist CEP290 eine bemerkenswerte Pleiotropie auf, da das Spektrum von isolierter Blindheit bei der LCA bis zum infaust verlaufenden MKS reicht und sich gleichzeitig in multiplen Organsystemen, vor allem Niere, ZNS und Auge, manifestieren kann [4,57,88]. Trotz dessen ist auch die exakte Funktion des CEP290-Proteins bisher nur unvollständig verstanden.

Das Hauptziel dieser Arbeit war darauf basierend die Gewinnung von genaueren Erkenntnissen zur Funktionsweise der Transitions-Zone, insbesondere der ziliären Barriere, sowie der molekularen Funktion von CEP290 als integralen Bestandteil dieser. Dafür sollten ziliär dysfunktionale CEP290-Mutanten näher untersucht werden, um daneben auch die Pathogenese der mit CEP290-assoziierten Ziliopathien näher aufzuklären. Somit bestand das erste Ziel der Arbeit in der Generierung von *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinien, welche definierte *CEP290*-assoziierte Mutationen stabil integrieren sollten. Anschließend sollte eine differenzierte Charakterisierung der erzeugten *CEP290*-Mutanten erfolgen, welche zunächst die Bestimmung der Wachstumsraten und die Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung der unterschiedlichen CEP290-Varianten umfassen sollte. Weitergehend sollten die Zelllinien dann auch noch hinsichtlich einer möglicherweise veränderten ziliären Proteinkomposition analysiert werden. Der Fokus sollte hierbei auf Proteinen liegen, welche in einer ersten Analyse der *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie im Vergleich zum Wildtyp depletiert im Zilium vorlagen. Daneben sollte die subzelluläre Verteilung des bekannten CEP290-Interaktionspartners Pcm-1 untersucht werden. Schlussendlich sollten so Rückschlüsse auf eine bei CEP290-assoziierten Ziliopathien potentiell gestörte ziliäre Barrierefunktion ermöglicht sowie die Rolle von CEP290 selbst und dessen Interaktionspartnern näher geklärt werden.

Daher sollte diese Arbeit dazu beitragen grundlegende Erkenntnisse über die Funktion der Transitions-Zone und der pathophysiologisch so relevanten ziliären Barriere zu gewinnen. Das molekulare Verständnis der mit CEP290-assoziierten Ziliopathien soll potentielle Fortschritte in der Diagnostik und Therapie von Ziliopathien in der Zukunft hoffentlich einen wichtigen Schritt voranbringen.

3. Material & Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien und Bakterienstamm

IMCD3-Zelllinie

Die IMCD3-Zelllinie wurde 1991 von Micheal Rauchman etabliert [71]. IMCD steht dabei für "inner medullary collecting duct" (inneres medulläres Sammelrohr) und beschreibt die ursprüngliche Herkunft der Zellen aus der Niere. So isolierte Rauchman für die IMCD3-Zelllinie das terminale Drittel eines Sammelrohres der Niere aus einer SV40 tragenden transgenen Maus und kultivierte es. Die 3 im Namen bezeichnet die Nummer des damals selektierten Klons.

Die Zelllinie ist durch ein polares, epitheliales Wachstum charakterisiert und zeigt daneben noch weitere Merkmale einer differenzierten Zelle des Sammelrohres. Beispielsweise reagieren die Zellen auf Amilorid und ANP (atrialess natriuretisches Peptid) in physiologischer Weise, indem der transepithelial -von apikal nach basal- verlaufende Natrium-Transport gehemmt wird. Hierbei konnte der Amilorid-sensitive Natrium-Kanal auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Eine Adaptation der Zellen an ein mit Natriumchlorid und Urea versetztes Medium mit einer Osmolarität von bis zu 910 mosmol/kgH₂O ist möglich und zeigt die enorme osmotische Toleranz der Zelllinie. Dabei erfolgt in solch einem hypertonen Milieu, wie es auch im Nierenmark vorliegt, genau wie *in vivo* eine Akkumulation wichtiger Osmolyten wie Inositol und Sorbitol. Darüber hinaus ist die IMCD3-Zelllinie insbesondere durch das Ausbilden von Tight Junctions und der Sekretion des Peptidhormons Endothelin gekennzeichnet [71].

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten und in dieser Arbeit generierten Zelllinien.

Name	Genotyp	Herkunft
IMCD3-WT	wildtypisch, chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle, Zeocin-Resistenz	AG Mick
IMCD3-WT+MKS1-LAP	<i>MKS1-LAP</i> in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Blasticidin-Resistenz	AG Mick
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-}	<i>Cep290</i> inaktiviert	AG Mick

IMCD3- <i>Pcm-1</i> ^{-/-}	<i>Pcm-1</i> inaktiviert	AG Firat-Karalar
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT}	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{WT} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{W7C} Klon 4	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{W7C} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{W7C} Klon 5	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{W7C} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{E1902X} Klon 7	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{E1902X} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{E1902X} Klon 10	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{E1902X} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{Q1942X} Klon 2	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{Q1942X} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{Q1942X} Klon 5	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{Q1942X} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5} Klon 1	<i>Cep290</i> inaktiviert, Cave: Falsch-positiv	Diese Arbeit

IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5} Klon 4	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{L1141FfsX5} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
IMCD3- <i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5} Klon 5	<i>Cep290</i> inaktiviert, <i>LAP-CEP290</i> ^{L1141FfsX5} in die chromosomale <i>FlpIn</i> -Rekombinasestelle integriert, Hygromycin-Resistenz	Diese Arbeit
RPE-WT	wildtypisch	AG Mick

Tabelle 2: Übersicht über den verwendeten Bakterienstamm.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Mach1 T1 ^R	F ⁻ ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>ΔrecA1398 endA1 tonA</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.2. Antikörper

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. IF, Immunfluoreszenz; WB, Western Blot; MG, Molekulargewicht

Name	Art.-Nr.	Hersteller	Spezies	Verdünnung	MG
Anti-β-Aktin	1485/10.	AG Zimmermann	Kaninchen	1:10.000 (WB)	42 kDa
Anti-γ-Tubulin	66320-1- AP	Proteintech Group, Inc.	Maus	1:500 (IF)	51 kDa
Anti-GFP	k.A.	AG Nachury	Kaninchen	1:1000 (WB)	27 kDa
Anti-GFP	11 814 460 001	Roche AG	Maus	1:1000 (WB)	27 kDa
Anti-S-tag	MA1-981	Thermo Fisher Scientific Inc.	Maus	1:1000 (WB)	1,75 kDa
Anti-hCEP290	22490-1- AP	Proteintech Group, Inc.	Kaninchen	1:1000 (WB)	290 kDa

Anti-ARL13B	17711-1-AP	Proteintech Group, Inc.	Kaninchen	1:1000 (IF)	48 kDa
Anti-IFT88	13967-1-AP	Proteintech Group, Inc.	Kaninchen	1:200 (IF) 1:1000 (WB)	94 kDa
Anti-FAM92A1	24803-1-AP	Proteintech Group, Inc.	Kaninchen	1:200 (IF)	29 kDa
Anti-PCM-1	k.A.	AG Firat-Karalar	Kaninchen	1:500 (IF)	228 kDa
Anti-acetyliertes Tubulin 6-11B-1	T7451	Sigma-Aldrich	Maus	1:2000 (IF)	50 kDa

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.

Name	Art.-Nr.	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti-Kaninchen Cy5	711-175-152	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.	Esel	1:500
Anti-Maus IgG2b Cy3	115-165-207	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.	Ziege	1:500
Anti-Maus IgG2a AF488	115-545-206	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.	Ziege	1:500
Anti-Maus IgG2a Cy5	115-175-206	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.	Ziege	1:500
Anti-Kaninchen HRP	AP187P	Merck KGaA (Millipore)	Ziege	1:5000
Anti-Maus HRP	AP127P	Sigma-Aldrich	Ziege	1:5000

3.1.3. Kits

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Kits.

Kits	Hersteller
GoTaq [®] Green 2 x Mastermix	Promega Corporation
Gateway LR Clonase [™] II Enzymmix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)
Monarch Plasmid Miniprep Kit	New England Biolabs GmbH
Q5 [®] Hot Start 2 x Mastermix	New England Biolabs GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN N.V.
Quick-DNA Miniprep Kit	Zymo Research Europe GmbH
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN N.V.
SuperScript [™] II	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)
SYBR [™] Green 2 x PCR Mastermix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Applied Biosystems)

3.1.4. Chemikalien

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Bezugsquelle
30% (w/v) Acrylamid, 37,5:1	Carl Roth GmbH + Co. KG
AEBSF-HCl	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Aprotinin	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
10% (w/v) APS	Grüssing GmbH
Bambanker [®]	FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
Biotin	Sigma-Aldrich

Biotin-Phenol	Iris Biotech GmbH
Bradford-Reagenz Roti [®] -Quant	Carl Roth GmbH + Co. KG
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG
BSA	Sigma-Aldrich
Coomassie-Brillant-Blau R-250	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG
DMEM/F-12	Thermo Fisher Scientific Inc. (Gibco)
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG
DTT	Carl Roth GmbH + Co. KG
E-64	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
ECL-Substrat Super Signal [™] West Pico Plus	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)
99% (w/v) EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG
Eindeckmedium + DAPI	Carl Roth GmbH + Co. KG
Essigsäure	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Chemical)
Ethanol	Biesterfeld Spezialchemie GmbH
10 x FastDigest Green Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)
FBS	Thermo Fisher Scientific Inc. (Gibco)
FuGENE [®] 6	Promega Corporation
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)
99% (w/v) Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hefeextrakt	Becton Dickinson

30% (v/v) H ₂ O ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hygromycin B	Carl Roth GmbH + Co. KG
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
Kaliumchlorid	Grüssing GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kristallviolett	Merck KGaA
Magermilchpulver	Sucofin®
Methanol	Biesterfeld Spezialchemie GmbH
Natriumascorbat	Thermo Fisher Scientific Inc. (Acros Organics)
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid	Grüssing GmbH
1 x NuPAGE Tris-Acetat Laufpuffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)
Opti-MEM™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Gibco)
1 x PBS	Thermo Fisher Scientific Inc. (Gibco)
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc. (Gibco)
peqGOLD Universalagarose	VWR International
peqGREEN	VWR International
16% (w/v) PFA	Electron Microscopy Sciences
Protease-Inhibitor PMSF	Carl Roth GmbH + Co. KG
Proteasom-Inhibitor MG132	Sigma-Aldrich
Proteinleiter HiMark™ Prestained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)
Proteinleiter Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)

RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)
Salzsäure	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Spectinomycin	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trolox	Thermo Fisher Scientific Inc. (Acros Organics)
0,05% (w/v) Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific Inc. (Gibco)
Trypton aus Casein	Becton Dickinson
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG
Urea	Thermo Fisher Scientific Inc. (MP Biomedicals)

3.1.5. Geräte und Verbrauchsmittel

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel.

Geräte und Verbrauchsmittel	Bezugsquelle
3-8% Tris-Acetat-Gele	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)
6-, 24-, 48-Well-Wachstumsschalen	Greiner Bio-One International GmbH
Absaugvorrichtung	neoLab Migge GmbH
Blockheizgerät SBH200DL	Stuart Equipment
Chromatographie-Papier	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Deckgläschen 12 mm	Menzel-Gläser

Elektrophorese-Netzgerät Consort EV2650	Cleaver Scientific
Falcon 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Feinwaage ALJ	KERN & SOHN GmbH
Geldokumentationssystem Imager 600	GE Healthcare (Amersham plc)
Glasperlen	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
Glasschraubflaschen	Schott AG
Inkubator für Mikroorganismen	Thermo Fisher Scientific Inc. (Heraeus)
Inverses Fluoreszenzmikroskop Leica DMI8	Leica Camera AG
Kryoröhrchen für Mikroorganismen und Säugerzellen	Greiner Bio-One International GmbH
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf AG
Kühlzentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific Inc. (Heraeus)
Laufkammern/Gelkämme (Agarosegelelektrophorese)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Laufkammern/Gelkämme (SDS-PAGE mit Gradientengel)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)
Laufkammern/Gelkämme (SDS-PAGE)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Magnetrührer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
qPCR-Cycler Mic	Bio Molecular Systems
Mikroplatten-Reader Tecan Reader SPARK 10M	Tecan Group AG
Mikroskop Leica DMI1	Leica Camera AG
Minitischzentrifuge	Biozym Scientific GmbH
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
Objektträger	RS France
Parafilm	Bemis Company
pH-Meter pH7110	inoLab®

Pipetten 5000 µl, 1000 µl; 200 µl; 20 µl; 10 µl, 2 µl	Brandt® GmbH & Co. KG; Gilson International B.V.
Pipettenspitzen TipOne	STARLAB International GmbH
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brandt® GmbH & Co. KG
Präzisionswischtücher	Kimberley-Clark Corporation
PVDF-Membran Immobilon-P	Merck KGaA (Millipore)
Reaktionsgefäß 2 ml; 1,5 ml, 0,2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
Ringe zur Selektion von Klonen	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
Rolltaumler	Phoenix Instrument GmbH
Säulen für Streptavidin-Chromatographie	MoBiTec
Schüttelinkubator für Mikroorganismen	Infors AG
Schwämme für Western Blot	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Serologische Pipetten 2ml; 5ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)
Streptavidin Sepharose <i>Beads</i>	GE Healthcare
Taumelschüttler	neoLab Migge GmbH
Thermocycler	VWR International (peqLab)
Thermomixer HC	STARLAB International GmbH
Vernichtungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG
VortexGenie 2	Scientific Industries, Inc.
Waage PCB	KERN & SOHN GmbH
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)
<i>Wet-Blot</i> Transfer-System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Zellkulturinkubator Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific Inc. (Thermo Scientific)
Zellkulturschaber	Thermo Fisher Scientific Inc. (Fisher Scientific)

Zellkulturschalen 100 x 20 mm; 145 x 20 mm	Greiner Bio-One International GmbH
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG

3.1.6. Software

Tabelle 8: Übersicht über die verwendete Software.

Software	Bezugsquelle
Affinity Designer	Serif Ltd.
Benchling	Benchling, Inc.
Fiji	Open Source
GraphPad Prism 6 [®]	GraphPad Software, Inc.
Image Studio Lite 2 (Version 5.2.5.)	LI-COR Biosciences GmbH
Leica Application Suite X	Leica Microsystems GmbH
Microsoft Office	Microsoft Corporation

3.1.7. Kulturmedien und Puffer

Tabelle 9: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien und Puffer.

Kulturmedien für Mikroorganismen	
<u>100 mg/ml Ampicillin-Stocklösung</u>	
Ampicillin	1 g
ddH ₂ O	ad 10 ml
<u>100 mg/ml Streptomycin-Stocklösung</u>	
Streptomycin	1 g
ddH ₂ O	ad 10 ml
<u>LB-Medium</u>	
Trypton aus Casein	10 g
NaCl	5 g
Hefeextrakt	5 g
ddH ₂ O	ad 1 l

<u>LB-Agar</u>	
Trypton aus Casein	10 g
NaCl	5 g
Hefeextrakt	5 g
Agar	15 g
ddH ₂ O	ad 1 l
Zellkulturmedien	
<u>Zellkulturmedium</u>	
DMEM/F-12	
FBS	10% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
<u>0,2% FBS <i>Starving</i> Zellkulturmedium</u>	
DMEM/F-12	
FBS	0,2% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
Lyse von Säugerzellen	
<u>Protease-Inhibitor AAE</u>	
AEBSF-HCl	1 M
Aprotinin	0,8 mM
E-64	15 mM
<u>Lysepuffer</u>	
TRIS/HCl pH 7,5	25 mM
NaCl	300 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	10%
Frisch zugeben:	
Triton X-100	1% (v/v)
SDS	0,2% (v/v)
PMSF	0,25% (v/v)
AAE	0,1% (v/v)

Agarose-Gelelektrophorese	
<u>50 x TAE-Puffer</u>	
TRIS	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
<u>4 x Laemmli-Probenpuffer</u>	
TRIS/HCl pH 6,8	200 mM
SDS	8% (v/v)
Glycin	40% (v/v)
Bromphenolblau	0,04% (v/v)
DTT (frisch zugeben)	200 mM
<u>SDS-Laufpuffer (in ddH₂O)</u>	
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	3,47 mM
<u>5% Sammelgel (2 Gele)</u>	
ddH ₂ O	2,28 ml
0,5 M TRIS/HCl pH 6,8	1 ml
30% (w/v) Acrylamide, 37.5:1	660 µl
10% (v/v) SDS	40 µl
TEMED	4 µl
10% (w/v) APS	40 µl
<u>10% Trenngel (2 Gele)</u>	
ddH ₂ O	4,48 ml
2 M TRIS/HCl pH 8,8	2 ml
30% (w/v) Acrylamide, 37.5:1	3,32 ml
10% (v/v) SDS	100 µl
TEMED	8 µl
10% (w/v) APS	80 µl

Western Blot	
<u>Transferpuffer</u>	
TRIS/HCl (pH 7,6)	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol (frisch zugeben)	20% (v/v)
<u>TBS-T</u>	
TRIS/HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	137 mM
Tween-20	0,2% (v/v)
ddH ₂ O	
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	
Ethanol	40% (v/v)
ddH ₂ O	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie-Brillant-Blau	0,1% (w/v)
<u>Entfärbelösung</u>	
Ethanol	40% (v/v)
ddH ₂ O	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
<u>Blockierlösung</u>	
Magermilchpulver	5% (g/v)
TBS-T (1x)	
Proximity Labelling und Streptavidin-Chromatographie	
<u>Quenching Puffer ohne Trolox</u>	
Natriumascorbat	10 mM
Natriumazid	10 mM
1 x PBS	ad 100 ml
<u>Quenching Puffer mit Trolox</u>	
Natriumascorbat	10 mM
Natriumazid	10 mM
Trolox	5 mM
1 x PBS	ad 100 ml

<u>Lysepuffer (APEX)</u>	
TRIS/HCl pH 7,5	25 mM
NaCl	300 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	10%
Natriumascorbat	10 mM
Natriumazid	10 mM
Trolox	5 mM
ddH ₂ O	
Frisch zugeben:	
Triton X-100	0,5% (v/v)
SDS	0,1% (v/v)
PMSF	0,25% (v/v)
AAE	0,1% (v/v)
<u>Urea-Waschpuffer</u>	
Urea	4 M
TRIS pH 7,5	10 mM
ddH ₂ O	ad 10 ml
<u>Biotin-Phenol</u>	
Biotin-Phenol	50 mM
DMSO	495 µl
<u>100 mM H₂O₂</u>	
30% (v/v) H ₂ O ₂	11,3 µl
ddH ₂ O	988,7 µl
Fixierung von Säugerzellen	
<u>10 x PBS</u>	
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
ddH ₂ O	ad 1 l
pH auf 7,4 einstellen	

<u>4% PFA-Lösung</u> 16% (w/v) PFA 10 x PBS ddH ₂ O	25% (v/v) 10% (v/v)
Wachstums-Assay	
<u>Kristallviolett-Färbelösung</u> Kristallviolett Ethanol ddH ₂ O	200 mg 10 ml 90 ml
Immunfluoreszenz-Mikroskopie	
<u>Blockierpuffer</u> FBS 10 x PBS 10% (v/v) Triton X-100 BSA ddH ₂ O	2,5 ml 5 ml 0,5 ml 1,5 g ad 50 ml

3.1.8. Plasmide

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten und in dieser Arbeit generierten Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDaM405 pENTR223.1_ humanCEP290iso1	<i>Entry</i> -Vektor für die Gateway-Klonierung, Spectinomycin-Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290	<i>DNASU</i> , <i>CloneID</i> : HsCD00353994
pDaM406 pENTR223.1_ humanCEP290 ^{W7C}	<i>Entry</i> -Vektor für die Gateway-Klonierung, Spectinomycin-Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation W7C	Diese Arbeit

pDaM407 pENTR223.1_ humanCEP290 ^{E1902X}	<i>Entry</i> -Vektor für die Gateway-Klonierung, Spectinomycin-Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation E1902X	Diese Arbeit
pDaM408 pENTR223.1_ humanCEP290 ^{Q1942X}	<i>Entry</i> -Vektor für die Gateway-Klonierung, Spectinomycin-Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation Q1942X	Diese Arbeit
pDaM409 pENTR223.1_ humanCEP290 ^{L1141FfsX5}	<i>Entry</i> -Vektor für die Gateway-Klonierung, Spectinomycin-Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation L1141FfsX5	Diese Arbeit
pDaM410 pOG44	<i>Flp</i> -Rekombinase Expressions-Vektor	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)
pMN403 pEF5B/FRT/LAP-DEST	<i>Destination</i> -Vektor für die Gateway-Klonierung, N-terminaler LAP- <i>tag</i> , Ampicillin-Resistenz, Hygromycin-Resistenz	Torres <i>et al.</i> , 2009
pDaM413 pEF5B/FRT/LAP-hCEP290	Expressions-Vektor, N-terminaler LAP- <i>tag</i> , Ampicillin-Resistenz, Hygromycin-Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290	Diese Arbeit
pDaM414 pEF5B/FRT/LAP-hCEP290 ^{W7C}	Expressions-Vektor, N-terminaler LAP- <i>tag</i> , Ampicillin-Resistenz, Hygromycin-Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation W7C	Diese Arbeit

pDaM415 pEF5B/FRT/LAP- hCEP290 ^{E1902X}	Expressions-Vektor, N-terminaler LAP- <i>tag</i> , Ampicillin-Resistenz, Hygromycin- Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation E1902X	Diese Arbeit
pDaM416 pEF5B/FRT/LAP- hCEP290 ^{Q1942X}	Expressions-Vektor, N-terminaler LAP- <i>tag</i> , Ampicillin-Resistenz, Hygromycin- Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation Q1942X	Diese Arbeit
pDaM417 pEF5B/FRT/LAP- hCEP290 ^{L1141FfsX5}	Expressions-Vektor, N-terminaler LAP- <i>tag</i> , Ampicillin-Resistenz, Hygromycin- Resistenz, enthält die cDNA der Isoform 1 des humanen CEP290 mit der Mutation L1141FfsX5	Diese Arbeit
pcDNA_PKAR1α-GFP	an GFP fusionierte regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A	Bereitgestellt von Eduard Stefan (Uni Innsbruck)

3.1.9. Enzyme

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle
<i>DpnI</i>	New England Biolabs GmbH
<i>XbaI</i>	New England Biolabs GmbH

3.1.10. Oligonukleotide

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Primer	Sequenz
Primer zur Mutagenese des humanen <i>CEP290</i>	
AR_P001_W7C_for	CCATGCCACCTAATATAAACTGTAAAGAAATAATGAA AGTTG
AR_P002_W7C_rev	CAACTTTCATTATTTCTTTACAGTTTATATTAGGTGGC ATGG
AR_P003_E1902X_for	GACCTAAAACCTATGAAATAAAAGAATGCTAAAGAA G
AR_P004_E1902X_rev	CTTCTTTAGCATTCTTTTATTTTCATAGGTTTTAGGTC
AR_P005_Q1942X_for	GGGGAAGTCTTTACTTTAACAAAGTAGTTGAATACTT TGAAGG
AR_P006_Q1942X_rev	CCTTCAAAGTATTCAACTACTTTGTTAAAGTAAAGAC TTCCCC
AR_P007_L1141FfsX5_for	GATAGGCAACGGATTCTAGAATTTAGAGAAGAATGA AATGG
AR_P008_L1141FfsX5_rev	CCATTTCAATTCTTCTCTAAATTCTAGAATCCGTTGCC TATC
Sequenzierprimer	
DaM-P720	CTGTGCCTTTGGTCTTGGAT
DaM-P721	TTGCCACTTTTTACCTTCTTCC
DaM-P722	TCTGTTCCATCTCAGCCAGA
DaM-P723	GGGCTCCTTTGGTATCCTTT
DaM-P724	CCGCTGCCTTTCATTTAATTC
DaM-P725	TTCTGAGAATTAATGATACTGGCACT
DaM-P726	CACGCTCTCTAAGTGCCTCA
DaM-P727	CATCAGTCATCTTCTCCATTTCC
EF-1 α _C-term_for	CCTCAGACAGTGGTTCAAAG
pEGFPC1for	GATCACTCTCGGCATGGAC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

Primer zur Validierung unspezifischer CEP290-Klone	
pEGFPC1for	GATCACTCTCGGCATGGAC
AR_P9_hCEP290_N-term_rev	AGCTCATTTACTTCCACCTTGG
AR_P010_hCEP290_mid_for	GGACTTCGTTAAAGCAAATGGAG
AR_P011_hCEP290_mid_rev	ACTTGGCAATGAGCGACTTT
qPCR-Primer	
mHPRT1 PH 871	GTCAACGGGGGACATAAAAGTTATTGG
mHPRT1 PH 872	GCTTGCAACCTTAACCATTTTGGG
mTBP PH 873	TTCTGAGAGCTCTGGAAATTGTACCGC
mTBP PH 874	AAAATCAACGCAGTTGTCCGTGG
AR_P012_EGFP_for_1	AAGTTCATCTGCACCACCG
AR_P013_EGFP_rev_1	TCCTTGAAGAAGATGGTGCG
AR_P014_EGFP_for_2	ACGTAAACGGCCACAAGTTC
AR_P015_EGFP_rev_2	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Plasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen wurde das „Monarch Plasmid Miniprep Kit“ von New England Biolabs® verwendet. Das Prinzip der Aufreinigung beruht dabei auf der Bindung der DNA an eine Silikamembran. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren.

3.2.1.2. Isolation genomischer DNA

Zur Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellkulturen wurde das „Quick-DNA Miniprep Kit“ von Zymo Research verwendet. Hierzu wurde je nach Konfluenz der Zellkulturen zunächst 2,5 bzw. 5 ml einer trypsinisierten Zellsuspension für 5 min bei 500 x *g* abzentrifugiert. Im Anschluss wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren, bei welchem ein spezieller Lysepuffer zum Einsatz kam, welcher einen anschließenden Verdau mit Proteinase K nicht erforderlich machte. Nachfolgend wurden durch sukzessive Waschschriffe PCR-Inhibitoren entfernt.

3.2.1.3. Isolation von RNA

Die Isolation von RNA aus Zellkulturen wurde mit dem „RNeasy Plus Mini Kit“ von QIAGEN durchgeführt. Das Verfahren basiert auf einer initialen Lyse der Zellen unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen und anschließender Entfernung von genomischer DNA durch spezielle Säulen. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren, außer dass zum Lysepuffer zur sicheren Inaktivierung von RNasen zusätzlich 10 U/ml „RiboLock RNase Inhibitor“ hinzugegeben wurde.

3.2.1.4. Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration

Die Quantifizierung von DNA/RNA-Konzentrationen erfolgte mittels eines Mikroplatten-Readers mit einer speziellen Quartzboden-Platte (Tecan Group). Hierbei wurde das Absorptionsmaximum der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich

wurden die Absorptionsmaxima bei 230 bzw. 280 nm ermittelt, um mögliche Verunreinigungen der Proben mit Salzen und Proteinen zu detektieren.

Konzentration DNA/RNA [$\mu\text{g/ml}$] = $A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$

Extinktionskoeffizient = 50 $\mu\text{g/ml}$ (doppelsträngige DNA); 40 $\mu\text{g/ml}$ (einzelnsträngige RNA/DNA) [1]

3.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Strängen wurde das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese angewandt, welches auf dem physikochemischen Prinzip der Trennung von DNA in einem elektrischen Feld anhand der Anzahl negativ geladener Phosphatreste und somit ihrer Länge beruht. Zur Vorbereitung eines 1% Agarosegels wurde 0,8 g „peqGOLD Universalagarose“ eingewogen und in 80 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Je nach gewünschter Porengröße des Gels wurde die Agarose-Konzentration entsprechend variiert. Nach kurzem Abkühlen wurde 4,2 μl (1:20.000) des Fluoreszenzfarbstoffs „peqGREEN“ in das Agarose-Gel gegeben. Nach Aushärtung wurde das Gel in die Laufkammer eingesetzt, in 1 x TAE-Puffer aufgenommen und je nach erforderlichem Größenbereich 5 μl der DNA-Leiter „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ bzw. „GeneRuler 100 bp DNA Ladder“ aufgetragen. Vor dem Laden der Proben erfolgte die Zugabe von je 1 μl „10 x FastDigest Green Buffer“ Ladepuffer zu jeder Probe. Die Gelelektrophorese wurde dann bei 120 V und 400 mA für circa 60 min durchgeführt. Anschließend wurden die Agarose-Gele in dem Geldokumentationssystem „Imager 600“ (Amersham plc) mittels Anregung der DNA-Stränge durch ultraviolettes Licht der Wellenlänge 260 nm dokumentiert.

3.2.1.6. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient in der Molekularbiologie zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen *in vitro* und wurde bereits 1986 von Mullis *et al.* entwickelt [59]. Die Grundlage der Reaktion stellt die Verwendung von einem 5`- und einem 3`-Primer dar, welche an die Template-DNA binden und so den zu amplifizierenden DNA-Sequenzabschnitt flankieren. Der Reaktionszyklus der PCR gliedert sich in eine initiale Denaturierungsphase, in welcher der als Template dienende DNA-Doppelstrang bei einer hohen Temperatur von 98°C vollständig denaturiert wird. Daran schließt sich die Anlagerungsphase mit einer Temperatur von 55-72°C an, in welcher die beiden Primer nun an die DNA-Einzelstränge binden können. In der darauf folgenden Elongationsphase

synthetisiert die DNA-Polymerase bei 72°C ausgehend von den angelagerten Primern den jeweiligen DNA-Strang neu. Hierbei wird die Reaktion durch den entsprechenden Primer nur in eine Richtung begrenzt. Daher werden mehrere aufeinander folgende Zyklen angewandt, so dass ab dem zweiten Zyklus die exponentielle Neusynthese des gewünschten DNA-Sequenzabschnittes stattfindet. Abschließend wird nach Beendigung aller Reaktionszyklen noch eine finale Elongationsphase angeschlossen, um sicherzustellen, dass die entstandenen PCR-Produkte am Ende in vollständiger Länge synthetisiert vorliegen.

Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Q5® Hot Start 2 x Mastermix/GoTaq® Green 2 x Mastermix	12,5 µl
5`-Primer	0,2-40 µM
3`-Primer	0,2-40 µM
DNA	20-500 ng
ddH ₂ O	ad 25 µl

Es wurde folgendes Programm im Thermocycler genutzt:

Initialdenaturierung	98°C	2 min	} 30 x
Denaturierung	98°C	20-30 s	
Anlagerung	55-72°C	30 s-1 min	
Elongation	72°C	(1 kb/10 s)	
Finale Elongation	72°C	5-10 min	

In den PCR-Reaktionen wurde in der Regel die „Q5® High-Fidelity DNA Polymerase“ von New England Biolabs® eingesetzt. Daneben wurde zur Testung von Primerpaaren die „GoTaq® DNA Polymerase“ von Promega verwendet. Beide Polymerasen waren bereits in den entsprechenden Kits in den Mastermixen enthalten. Optional wurden die generierten PCR-Produkte mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ von QIAGEN zur Sequenzierung aufbereitet. Es wurde dabei nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

3.2.1.7. Ortsgerichtete Mutagenese

Basierend auf dem Verfahren der PCR lassen sich durch den Einsatz von modifizierten Oligonukleotiden spezifische Mutationen in DNA-Sequenzen einbringen oder auch spezifische Tags anhängen. Es gibt dabei zahlreiche Varianten insbesondere in Bezug auf das Design dieser mutagenen Primerpaare, aber auch hinsichtlich der optimalen

Reaktionsbedingungen zur Mutagenese. In dieser Arbeit wurden vollständig überlappende Primerpaare zur ortsgerichteten Mutagenese von *CEP290* eingesetzt und nach einem Protokoll von Edelheit *et al.* verfahren [27]. Dieses Protokoll basierte auf zwei parallel verlaufenden Reaktionen, bei denen jeweils nur einer der beiden Primer eingesetzt wurde. Anschließend wurden die beiden Reaktionen vereint, denaturiert und in einem Abkühlungszyklus erfolgte die Anlagerung der Template-DNA und der neu synthetisierten DNA-Stränge aneinander. Als nächstes folgte ein Verdau der parentalen DNA mittels *DpnI* und die Transformation der mutierten DNA-Sequenz in kompetente *Escherichia coli*. Durch das beschriebene Vorgehen wird die Bildung von Primer-Dimeren verhindert und somit die Effizienz der Mutagenese erhöht.

3.2.1.8. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Plasmiden und PCR-Produkten wurde extern durch die Firma Eurofins Genomics (Köln, Deutschland) durchgeführt. Das Prinzip der Sequenzierung beruhte auf der Didesoxymethode (Kettenabbruchmethode) nach Sanger *et al.* aus dem Jahre 1977 [75].

3.2.1.9. LR Rekombination

Die LR Rekombination ist Teil der Gateway-Klonierung, welche eine Methode zur Klonierung von DNA-Sequenzen von Vektor zu Vektor darstellt. Grundlage dieser Technik bildet die Verwendung so genannter *Entry-* und *Destination*-Vektoren, die über LR-Rekombinationsstellen verfügen, welche die entsprechende DNA-Sequenz flankieren. An diesen Rekombinationsstellen kann eine Rekombinase ansetzen, um eine gezielte Rekombination dieses DNA-Sequenzabschnittes zwischen den beiden Vektoren zu katalysieren. Hierzu wurde das Kit „Gateway LR Clonase™ II Enzymmix“ von Invitrogen™ verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

3.2.1.10. Restriktionsverdau

Das gezielte Schneiden von DNA-Molekülen an spezifischen Sequenzen wird durch Restriktionsenzyme (Endonukleasen) ermöglicht. Neben der „klassischen“ Klonierung dient der Restriktionsverdau zur Überprüfung von Plasmid-DNA anhand der Abundanz von Schnittstellen und daraus resultierendem Restriktionsmuster in der Agarose-

Gelelektrophorese. Es wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs® verwendet. Die Inkubationszeit des Restriktionsverdau betrug 30 min bei einer Temperatur von 37°C.

Der Restriktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

Puffer (10 x)	1 µl
Endonuklease	1 µl
DNA	500-1000 ng
ddH ₂ O	ad 10 µl

Der Restriktionsverdau konnte im Folgenden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden.

3.2.1.11. Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA aus isolierter RNA wurde mittels des reverse Transkriptase Kits „SuperScript™ II“ von Invitrogen™ durchgeführt. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren, wobei als Ausgangsmenge zur Transkription 500 ng RNA eingesetzt wurde.

3.2.1.12. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) stellt eine Variante der PCR dar, welche 1993 von Higuchi *et al.* entwickelt wurde und bei der die exponentielle Amplifikation der DNA-Sequenz mit Hilfe der Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Hybridisierungs sonden, so genannten Taqman-Sonden [2], in Echtzeit verfolgt werden kann [38]. Hierbei besteht eine direkte Korrelation zwischen der als Template dienenden Ausgangsmenge an DNA und der Intensität des Fluoreszenzsignals. Denn je höher die Ausgangsmenge liegt, desto früher wird eine signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegende Fluoreszenzstärke, der so genannte CT-Wert (*Threshold cycle* = Schwellenwert-Zyklus), erreicht [38,39]. Die qPCR ermöglicht somit die quantitative Bestimmung der Expressionslevel von Genen, indem isolierte mRNA in cDNA transkribiert wird und in der qPCR dann spezifische Primer zur Amplifikation eines DNA-Sequenzabschnittes dieses Zielgens eingesetzt werden [39]. Gleichzeitig wird bei der relativen Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse zur Kontrolle von gleichen Ausgangsmengen an cDNA immer auch noch

ein Haushaltsgen in der qPCR mitgemessen und folglich eine Normalisierung des gemessenen Expressionslevels des Zielgens vorgenommen [39].

In dieser Arbeit wurde für die qPCR der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR™ Green“ verwendet, welcher sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert [39]. Hierbei wurden jeweils technische Duplikate der Negativkontrolle, des Wildtyps sowie aller Mutanten mit beiden Primerpaaren, für das Zielgen sowie das Haushaltsgen, angesetzt.

Pro qPCR wurde folgender Ansatz angesetzt:

SYBR™ Green 2 x PCR Mastermix	2,5 µl
5'-Primer	0,75 µl (2,67 µM)
3'-Primer	0,75 µl (2,67 µM)
cDNA (1:10 von RT-Reaktion mit 500 ng eingesetzter RNA)	1 µl

Es wurde folgendes Programm im qPCR-Cycler genutzt:

Initialdenaturierung	95°C	2 min	} 40 x
Denaturierung	95°C	20 s	
Anlagerung	60°C	20 s	
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Schmelze	72-95°C	0,3°C/s	

In allen qPCR-Reaktionen wurde die im „SYBR™ Green 2 x PCR Mastermix“ enthaltene „AmpliAq Gold® DNA Polymerase“ von Applied Biosystems™ verwendet.

3.2.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1. Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (*lysogeny broth medium*) unter Zugabe von 1/1000 des zur Selektion benötigten Antibiotikums. Die Kultur wurde bei 37°C und 180 U/min ü.N. inkubiert.

3.2.2.2. Hitzeschock-Transformation

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in die Bakterienstämme wurde das von Inoue *et al.* etablierte Verfahren der Hitzeschock-Transformation angewandt [41]. Hierzu wurden pro Transformationsansatz jeweils 50 µl Hitzeschock-kompetente *Escherichia coli* (MACH1™) auf Eis aufgetaut. Danach wurde 50-100 ng des zu transformierenden Plasmids zu den Zellen hinzugegeben, resuspendiert und der Ansatz 5-15 min auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden im Thermocycler und eine anschließende Inkubation für 2-3 min auf Eis. Nun wurde 500 µl LB-Medium zu den Zellen hinzugegeben und für 45-60 min bei 37°C sowie 1000 U/min auf dem Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 6000 x g für 1 min abzentrifugiert, das LB-Medium bis auf eine restliche Menge von circa 50 µl abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde schließlich mit Hilfe von Glasperlen gleichmäßig auf Antibiotikahaltigen LB-Platten verteilt und diese bei 37°C ü.N. inkubiert. Der Erfolg der Transformation konnte am nächsten Tag durch das Wachstum von Kolonien verifiziert werden.

3.2.2.3. Herstellung von bakteriellen Kryokulturen

Die Herstellung von bakteriellen Kryokulturen erfolgte aus am Vortag angeimpften Übernachtskulturen der Bakterienstämme. Davon wurden unter der sterilen Glocke jeweils 800 µl abgenommen und in Kryoröhrchen mit 200 µl 80% Glycerin vermischt. Anschließend wurden die Kryokulturen bei -80°C eingelagert.

3.2.3. Zellkulturbasierte Methoden

3.2.3.1. Kultivierung von Zelllinien

Zur Kultivierung wurden die Zelllinien nach der Passagierung in Zellkulturmedium (DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration in einem Luftfeuchtigkeits-kontrollierten CO₂-Inkubator je nach Konfluenz für 2-3 Tage inkubiert.

3.2.3.2. Passagierung von Zellkulturen

Zur Passagierung von Zellkulturen wurde zunächst lichtmikroskopisch die Konfluenz der Zellen in den Zellkulturschalen bestimmt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und

die Zellen durch Zugabe von 10 ml 1 x PBS unter vorsichtigen Schwenkbewegungen gewaschen. Danach wurde das 1 x PBS abgenommen und 1 ml auf RT erwärmte 0,05% Trypsin-EDTA Lösung hinzugegeben. Nach dem Verteilen des Trypsin-EDTA durch kurzes Schwenken der Zellkulturschale wurde diese für 5 min im Zellkulturinkubator bei 37°C inkubiert. Durch die Inkubation mit der Endopeptidase Trypsin lösen sich die Zell-Zell- sowie Zell-Oberflächenverbindungen ab [10], die vollständige Ablösung der Zellen wurde hierbei unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 10 ml auf 37°C erwärmtem Zellkulturmedium (DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und je nach zuvor bestimmter Konfluenz der Zellen in Verdünnungen von 1:3 bis 1:20 in neuen Zellkulturschalen ausgesät. Das Ziel war hierbei nach der geplanten Inkubationszeit von 1-3 Tagen eine Konfluenz der Zellen zwischen 70-90% zu erreichen.

3.2.3.3. Zellzahlbestimmung einer Zellkultur mit der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellkultur erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde bei der Passagierung der Zellkultur eine geeignete Menge der trypsinierten Zellsuspension in die Kammer pipettiert. Anschließend wurden unter dem Lichtmikroskop die Zellzahlen in jeweils 4 Quadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert aus diesen gebildet.

Für die Berechnung der Zellzahl wurde dann folgende Formel angewandt:

Mittelwert der gezählten Zellen in einem Quadranten $\times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$

3.2.3.4. Transfektion zur Generierung stabiler Zelllinien

Die stabilen Transfektionen der Zelllinien erfolgten mit zwei unterschiedlichen methodischen Ansätzen, der *forward* und der *reverse* Transfektion. Der Unterschied zwischen den beiden Verfahren lag im Zeitpunkt der Aussaat der Zellen für die Transfektion, welcher beim *forward* Ansatz 24 Stunden vor der Transfektion und beim *reverse* Ansatz erst unmittelbar vor der Transfektion lag. Hierzu wurden pro Transfektionsansatz jeweils 250.000 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium ausgesät. Dabei wurden vor Aussaat Deckgläschen in die 6-Well-Wachstumsschalen gelegt, um eine anschließende Untersuchung der Effizienz der stabilen Transfektionen mittels Immunfluoreszenz zu ermöglichen.

Das restliche im Folgenden beschriebene Prozedere unterschied sich nicht zwischen den beiden Ansätzen. Der erste Schritt der Transfektionen bestand darin, pro

Transfektionsansatz 50 μl (bzw. 45,2 μl) auf 37°C erwärmtes „Opti-MEM™“ Transfektionsmedium mit 3 μl (bzw. 4,8 μl) auf RT aufgewärmtem FuGENE® 6 Transfektionsreagenz vorsichtig in einem Reaktionsgefäß zu mischen und 2-5 min bei RT zu inkubieren. Die in den Klammern aufgeführten Mengen haben sich für die durchgeführten Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation als effizienter erwiesen. Daneben wurde pro Transfektionsansatz jeweils 50 μl auf 37°C erwärmtes „Opti-MEM™“ mit 1200 ng *Flp*-Rekombinase Expressions-Vektor (pOG44) und 400 ng des jeweiligen zu transfizierenden Plasmids vermischt. Anschließend wurden jeweils 50 μl der Opti-MEM™: FuGENE® 6 Suspension zu jedem Ansatz hinzugegeben, vorsichtig vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Zudem wurde im Rahmen der Transfektionen stets eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der nur der *Flp*-Rekombinase Expressions-Vektor (pOG44) mit der Opti-MEM™: FuGENE® 6 Suspension inkubiert wurde. Nach der 30-minütigen Inkubation wurden die kompletten Ansätze von je 100 μl tropfenweise in die vorbereiteten 6-Well-Wachstumsschalen mit den ausgesäten Zellen pipettiert, sanft geschüttelt und anschließend im Zellkulturinkubator inkubiert.

3.2.3.5. Transiente Transfektion von Zelllinien

Für die entweder als *forward* oder *reverse* Ansatz (siehe Abschnitt 3.2.3.4.) durchgeführten transienten Transfektionen wurden je 50.000 Zellen in 0,5 ml Zellkulturmedium auf Deckgläschen zur Immunfluoreszenz-basierten Bestimmung der Transfektionsraten ausgesät. Entsprechend der geringeren Zellzahl im Vergleich zu den stabilen Transfektionen wurde pro Transfektionsansatz als erstes 25 μl „Opti-MEM™“ mit 0,75 μl „FuGENE® 6“ vermischt und 2-5 min inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 250 ng des jeweiligen zu transfizierenden Plasmids gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Der zur stabilen Transfektionen von Zelllinien notwendige *Flp*-Rekombinase Expressions-Vektor (pOG44) wurde hier nicht mit in den Transfektionsansatz gegeben, da die Transfektionseffizienz bei diesem Ansatz anhand der transienten Transfektionsraten bestimmt werden sollte. Zudem wurde auch im Rahmen der transienten Transfektionen stets eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der nur die Opti-MEM™: FuGENE® 6 Suspension inkubiert wurde. Nach der 30-minütigen Inkubation wurden die kompletten Ansätze von je 25 μl in die vorbereiteten 6-Well-Wachstumsschalen mit den ausgesäten Zelllinien pipettiert, sanft geschüttelt und anschließend im Zellkulturinkubator inkubiert.

3.2.3.6. Selektion von Klonen

Nach 24-stündiger Inkubation der stabil transfizierten Zellen (siehe Abschnitt 3.2.3.4) wurden diese auf große Zellkulturschalen (145 x 20 mm) umverteilt. Dabei wurden eine „2/3 Verdünnung“, 21 ml Medium + 4 ml trypsinierte Zellsuspension, und eine „1/6 Verdünnung“, 24 ml Medium + 1 ml trypsinierte Zellsuspension, hergestellt. Daneben wurden die restlichen Zellen zurück in die ursprüngliche 6-Well-Wachstumsschale transferiert („Pool“). Nach weiteren 24 Stunden Inkubation erfolgte die Zugabe von jeweils 200-250 µg/ml Hygromycin B, welches die Proteinbiosynthese in Pro- und Eukaryoten inhibiert [66,70]. Die generierten Plasmide mit den zu untersuchenden *CEP290*-Varianten trugen dabei ein Resistenzgen gegen Hygromycin B, welches eine Kinase exprimiert, die Hygromycin B inaktivieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich eine Zugabe von Hygromycin B direkt im Anschluss an die Umverteilung der transfizierten Zellen in die Zellkulturschalen statt nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit als vorteilhaft, da die finale Zahl von Klonen höher ausfiel.

Nachfolgend wurde das Medium der Zellkulturen alle 2-3 Tage abgesaugt und durch neues mit Hygromycin versetztes Medium ausgetauscht, bis makroskopisch nur noch vereinzelte Kolonien sichtbar waren. Das Heranwachsen der klonalen Zellkolonien betrug im Mittel zwischen zwei und drei Wochen. Anschließend wurden die Zellkulturschalen abgesaugt, zweimal mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und auf die einzelnen Kolonien eingefettete, sterile Glasringe gesetzt. Danach wurde jeweils 50 µl auf RT erwärmtes Trypsin in die Ringe gegeben und die Zellen für 5 min bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Klone in den Ringen in 50 µl Zellkulturmedium resuspendiert und in 24-Well-Wachstumsschalen transferiert, in denen jeweils 0,5 ml mit Hygromycin versetztes Medium vorgelegt wurde. Die Klone wurden anschließend im Zellkulturinkubator kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte hierbei eine Passagierung der Zellen mit Hygromycin-versetztem Medium, bis nur noch wenige Klone durch den persistierenden Selektionsdruck überlebten. Danach wurde die Hygromycin-Selektion beendet und die Klone mittels Kryokonservierung gesichert.

3.2.3.7. Herstellung von Kryo-Zellkulturen

Zur Erstellung von Kryo-Zellkulturen wurden die Zelllinien zunächst passagiert. Die verbleibenden Zellsuspensionen wurden danach bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets entsprechend der Anzahl geplanter Stocks in je 250 µl Einfriermedium Bamberker[®] resuspendiert, welche zuvor anhand der Konfluenz der Zellen

bestimmt wurde. Die Zellsuspensionen wurden dann zu je 250 µl in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.3.8. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Der erste Schritt bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestand darin, eine 24-Well-Wachstumsschale mit autoklavierten Deckgläschen vorzubereiten und diese für 15 min mit UV-Licht zu bestrahlen. Danach wurden die jeweiligen Zellkulturen passagiert, die Zellzahlen der trypsinisierten Zellsuspensionen bestimmt und jeweils 50.000 Zellen pro Well ausgesät. Bei den Kontrollen der Transfektionsraten der stabilen und transienten Transfektionen wurde bis zu diesem Punkt bezüglich des Zeitpunktes der Aussaat bzw. der Zellzahl geringfügig anders verfahren (siehe Abschnitte 3.2.3.4. und 3.2.3.5.).

Nach 24 Stunden Inkubation wurden die auf den Deckgläschen adhärenen Zellen mit 1 x PBS gewaschen und die Wachstumsfaktoren entzogen, indem ein Wechsel auf ein Wachstumsmedium mit 0,2% FBS erfolgte. Durch den Entzug der Wachstumsfaktoren wird der Zellzyklus arretiert und die Bildung von primären Zilien induziert [3]. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Fixierung der Zellen, ab welcher die Zellen durchgehend möglichst lichtgeschützt behandelt wurden. Hierzu wurden die Zellen zunächst 2 min bei RT mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 330 µl 4% PFA für 10-15 min bei RT fixiert. Danach folgten drei Waschschrte mit 1 x PBS mit jeweils 5 min Inkubation bei RT. Anschließend wurde 0,5 ml eiskaltes 100% Methanol zugegeben und die Zellen 5 min bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurde für mind. 30 min mit 1 x PBS gewaschen, wobei das PBS alle 5 min gewechselt wurde. Im Anschluss hieran waren die Zellen fertig fixiert sowie permeabilisiert und konnten optional bei 4°C zwischengelagert werden.

Nun folgte die Immunfluoreszenzfärbung, wobei die einzelnen Deckgläschen mit den Zellen zunächst in eine Schale auf dicke Tropfen von 1 x PBS überführt wurden. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, anschließend 100 µl Blockierpuffer hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde erneut dreimal für jeweils 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Nun wurden pro Deckgläschen 50 µl des Primärantikörpers in der entsprechenden Verdünnung auf die Zellen gegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Hiernach folgte wiederum ein dreimaliger Waschschrte mit 1 x PBS für jeweils 5 min. Danach wurden pro Deckgläschen 50 µl des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers in der entsprechenden Verdünnung auf die Zellen gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit 1 x PBS für jeweils 5 min. Währenddessen wurden pro Deckgläschen 5 µl Eindeckmedium auf einen Objektträger vorgelegt, welches den DNA anfärbenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthielt. In die

vorgelegten Tropfen wurden nun die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach unten gelegt und für mind. 3 Stunden bei RT im Dunkeln getrocknet. Anschließend wurden die angefärbten Zellen auf den Objektträgern mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI8) analysiert. Zur Bestimmung der Transfektionsraten bei den transienten und stabilen Transfektionen wurden die Zellen mit und ohne Fluoreszenzsignal im Zilium in mehreren Sichtfeldern ausgezählt. Anschließend wurde der Quotient der fluoreszierenden Zellen durch die Gesamtanzahl der Zellen gebildet. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Objektträger bei 4°C aufbewahrt.

3.2.3.9. Wachstums-Assay

Für den Wachstums-Assay wurden die Zelllinien zunächst in 48-Well-Wachstumsschalen in definierter Zellzahl, 12.500 pro Well, ausgesät. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten, 14, 38, 62 und 86 Stunden, wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und in 4% PFA fixiert. Hiernach wurden diese bei 4°C zwischengelagert. Nach erneutem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Färbung aller fixierten Zellen durch die Zugabe von jeweils 200 µl Kristallviolett-Färbelösung. Bei Kristallviolett handelt es sich um einen Perforationsfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 590 nm, welcher in die Zellen hinein diffundiert und sich an die DNA in den Zellkernen anlagert [62]. Die Färbereaktion wurde für 45 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mehrfach mit ddH₂O gewaschen und an der Luft bei RT getrocknet. Hiernach wurde zur Reextraktion des Farbstoffs 200 µl 10% Essigsäure in jedes Well pipettiert und die Zellen für 1 Stunde bei RT auf dem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurde zur Bestimmung der Wachstumsraten die Absorption bei 590 nm jeweils im technischen Triplikat gemessen.

3.2.3.10. Proximity Labelling

Zur vergleichenden Analyse ausgewählter ziliärer Proteine wurde ein auf der Technik des *Proximity Labelling* basierendes Verfahren zur gezielten Isolation ziliärer Proteine angewandt [56]. Hierbei wurden bereits in der AG Mick etablierte so genannte „Cilia-APEX“-Zelllinien verwendet, welche das an eine Proteindomäne des ziliären Proteins NPHP3 fusionierte APEX-Enzym stabil exprimierten. Das APEX-Enzym ist dazu in der Lage, unter Zugabe von H₂O₂ Biotin-Phenol in Biotin-Phenoxyradikale umzuwandeln, welche kovalent an die in einem Radius von < 20 nm umliegenden Proteine binden [56]. Der erste Schritt beim *Proximity Labelling* bestand somit in der Aussaat dieser „Cilia-APEX“-Zelllinien sowie einer wildtypischen Zelllinie als Negativkontrolle. Dabei wurden jeweils 2,5 x 10⁶ Zellen pro Well in

einem Endvolumen von 25 ml ausgesät und 2 Tage bis zum Erreichen einer hohen Konfluenz ($\geq 90\%$) kultiviert. Dann wurden die Zellkulturen mit 1 x PBS gewaschen und zur Bildung von Zilien durch den Entzug von Wachstumsfaktoren in 0,2% FBS *Starving* Wachstumsmedium 24 Stunden lang weiter inkubiert.

Anschließend wurde 0,5 mM Biotin-Phenol zu den Zellkulturen zugegeben. Zur Kontroll-Zelllinie wurde dasselbe Volumen DMSO gegeben. Nach dem Mischen wurden die Zellen für 45-60 min bei 37°C im Zellkulturinkubator weiter inkubiert. Nun erfolgte die Biotinylierung der ziliären Proteine durch Zugabe von 1 mM H₂O₂ zu den Kulturen, wonach die Schalen sofort geschwenkt und 3 min bei RT inkubiert wurden. Danach wurde das mit Biotinphenol und H₂O₂ versetzte Medium abgesaugt, 10 ml eiskalter *Quenching* Puffer ohne Trolox in die Schalen gegeben und diese auf Eis gelagert (alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml eiskaltem *Quenching* Puffer mit Trolox gewaschen und danach gründlich abgesaugt. Hiernach folgte die Zellyse durch die Zugabe von 1 ml Lysepuffer (APEX) und das Überführen der Zellsuspension mit einem Zellschaber in ein Eppendorfgefäß. Die Zellsuspension wurde anschließend gemischt und 15 min bzw. optional auch länger auf Eis inkubiert. Nachdem alle Zellsuspensionen gewonnen wurden, erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 16.000 x g. Danach wurden die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt und die Proteinkonzentrationen mittels Bradford Assay bestimmt. Anschließend wurden die Ganzzelllysate in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4. Biochemische Methoden

3.2.4.1. Herstellung von Ganzzelllysaten

Für die Herstellung von Ganzzelllysaten aus Zellkulturen wurde die jeweilige Zelllinie zunächst passagiert und die trypsinierte Zellsuspension anschließend bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen, das Pellet in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach folgte eine weitere Zentrifugation bei 200 x g für 5 min. Ab diesem Schritt wurde nicht mehr steril gearbeitet, der Überstand abgenommen und das Pellet auf Eis gelagert. Das Pellet wurde daraufhin vollständig in Lysepuffer resuspendiert, wobei je nach Zellanzahl ein Volumen zwischen 250 und 500 µl hinzugegeben wurde. Danach wurde das Lysat 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 16.000 x g und einer Temperatur von 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand des Lysates wurde daraufhin in ein neues Eppendorfgefäß

überführt, sofort auf Eis gelagert bzw. zur späteren Weiterverwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Optional erfolgte vor Herstellung der Ganzzelllysate die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132. Der Proteasom-Inhibitor MG132, auch unter dem Namen Celastrol bekannt, ist ein aus einer chinesischen Heilpflanze stammendes Peptidaldehyd [94]. Celastrol bindet kovalent an das aktive Zentrum der 20S-Untereinheit des Proteasoms und hemmt dadurch die proteolytische Aktivität des 26S-Proteasom-Komplexes [36]. Dazu wurde das Zellkulturmedium zur Einsparung von Reagenz zunächst auf 5 ml reduziert. Dann wurde 2,5 μl MG132 (20 mM Stock) hinzugegeben, was folglich einer Endkonzentration von 10 μM in der Zellkultur entsprach. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Zellkultur für weitere 5 Stunden inkubiert, bevor mit der Herstellung von Ganzzelllysaten begonnen wurde.

3.2.4.2. Bradford-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der 1976 entwickelte Bradford Assay angewendet, welcher auf einer kolorimetrischen Messung mittels des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau beruht [11]. Durch die Bindung an Proteine wechselt das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm [11], welches photometrisch mittels eines UV/VIS-Spektrophotometers oder Mikroplatten-Readers gemessen werden kann. Für den Bradford-Assay wurde zunächst eine Verdünnungsreihe ausgehend von einem Protein-Standard, hier BSA (Bovines Serumalbumin) mit einer Konzentration von 1,47 mg/ml, pipettiert, um bei der Messung eine Standardkurve mit den Konzentrationen 0; 2,5; 5; 10; 20 und 40 μg zu generieren. Pro Probe wurden jeweils 50 μl ddH₂O in Eppendorfgefäßen vorgelegt und dazu 2 μl des zu bestimmenden Lysates gegeben. Anschließend wurde jeweils 750 μl 1:5 verdünnte Bradford-Reagenz zu den Protein-Standards der Verdünnungsreihe und den Proben hinzugegeben, diese gemischt und in eine 48-Well-Wachstumsschale überführt. Darauf folgten die Absorptionsmessung im Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm und die Berechnung der Proteinkonzentrationen anhand der Standardkurve.

3.2.4.3. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) stellt ein erstmals 1970 von Laemmli, U.K. beschriebenes Verfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht dar [48]. Dazu erfolgt die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) zu den Proteinproben, welches die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufhebt und

gleichzeitig deren Eigenladungen überdeckt. Durch den Zusatz von Dithiothreitol (DTT) werden zudem die Disulfidbrückenbindungen der Proteine durch Reduktion gespalten. Die Trennung der denaturierten Proteine erfolgt mittels eines diskontinuierlichen Gelelektrophoresesystems bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, welche sich durch unterschiedliche Porengrößen unterscheiden. Das Sammelgel dient mit einem größeren Porendurchmesser der Konzentrierung der Proben, während die Auftrennung der Proteine im Trenngel stattfindet.

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE wurde als erstes ein 10% Trenngel gegossen, welches direkt mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde dieses mit einem 5% Sammelgel überschichtet und ein Probenkamm eingesetzt. Der Probenkamm wurde nach Auspolymerisation des Sammelgels entfernt und das fertige Gel in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt, welche zur Pufferung mit 1 x Laufpuffer gefüllt wurde. In der Arbeit wurden allerdings größtenteils kommerziell erhältliche Gradientengele, 3-8% Tris-Acetat-Gele von Invitrogen™, verwendet, welche mit 1 x NuPAGE Tris-Acetat Laufpuffer abgepuffert wurden. Darauf folgend wurden die zu untersuchenden Zellysate mit 1:4 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzt und mit Lysepuffer soweit verdünnt, dass nachfolgend eine Proteinmenge von 60 µg in jede Geltasche geladen werden konnte. Nach dem Vortexen wurden die Proteinlysate für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend bei 16.000 x g für 5 min abzentrifugiert. Nun wurde jeweils 15 µl (60 µg) Probe in eine Spur geladen. Zur Größenbestimmung wurde außerdem die für den jeweiligen Größenbereich geeignete Proteinleiter „HiMark™ Prestained Protein Standard“ (8 µl) bzw. „Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder“ (5 µl) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 1 Stunde und 30 min durchgeführt.

3.2.4.4. Western Blot

An die SDS-PAGE schloss sich ein Western Blot mit einem Proteintransfer in *Wet-Blot*-Technik an, um die aufgetrennten Proteine im Gel auf eine Trägermembran zu übertragen und diese anschließend mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren. Vorbereitend wurden zwei Schwämme, die Chromatographie-Papiere sowie das Gel aus der SDS-PAGE in 1 x Transferpuffer eingelegt. Zudem wurde die als Trägermembran dienende PVDF-Membran zur Aktivierung 1 min in 100% Methanol und danach ebenfalls in 1 x Transferpuffer eingelegt. Danach wurde der Proteintransfer in *Wet-Blot*-Technik, wie in Abbildung 5 gezeigt, zusammengebaut und in die mit 1 x Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1 Stunde und 30 min.

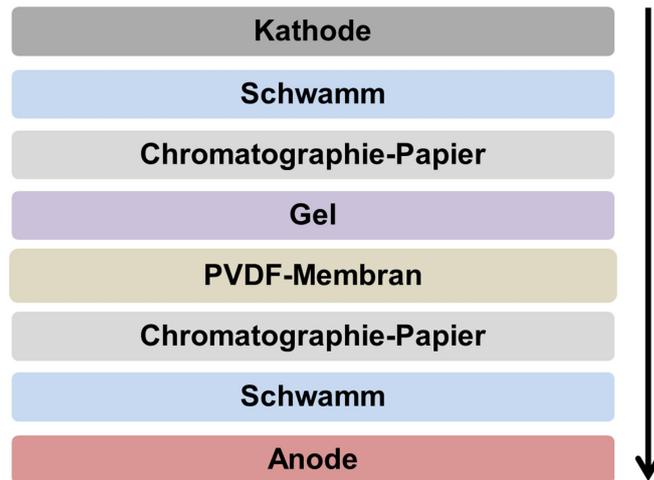


Abbildung 5: Schematische Darstellung des „Sandwich“-Aufbaus beim Western Blot in Wet-Blot-Technik. Die Proteine wandern in Pfeilrichtung aus dem Gel in die PVDF-Membran von der Kathode (schwarz) in Richtung der Anode (rot).

Nach Beendigung des Proteintransfers wurden die PVDF-Membran und das Gel in 1 x TBS-T eingelegt. Der Erfolg des Proteintransfers konnte nachfolgend optional durch eine Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau überprüft werden, dazu wurden das Gel für 30 s und die Membran für 10 s in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden diese 1 min in Entfärbelösung geschwenkt und nun überprüft, ob auf der Membran Proteinbanden bzw. auf dem Gel keine Proteinbanden sichtbar waren. Hiernach folgten mehrere Waschschriffe mit 100% Methanol zur Entfärbung der Membran, das Gel konnte an dieser Stelle verworfen werden.

Im Anschluss daran wurde die Membran dreimal 10 min mit 1 x TBS-T gewaschen und danach entweder für 1 Stunde oder ü.N. in 1 x Blockierlösung auf dem Taumelschüttler bei 4°C inkubiert. Hieran schloss sich wiederum dreimaliges Waschen für je 10 min mit 1 x TBS-T an. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper entweder für 1 Stunde oder ü.N. auf dem Taumelschüttler bei 4°C, welcher entsprechend in 1 x Blockierlösung verdünnt wurde. Es folgte wiederum dreimaliges Waschen für je 10 min mit 1 x TBS-T. Nun wurde der an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper für 30 min auf der Membran inkubiert, welcher ebenfalls entsprechend in 1 x Blockierlösung verdünnt wurde. Hiernach wurde dreimal 10 min mit 1 x TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine auf der Membran, indem durch die Zugabe von ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Substrat (Thermo Scientific) eine Chemolumineszenz-Reaktion durch die HRP katalysiert wurde. Die Lumineszenz wurde durch das Geldokumentationssystem „Imager 600“ (Amersham plc) aufgenommen. Optional konnte die Membran unter Berücksichtigung der bereits verwendeten Antikörper-Kombination mit weiteren Primär- und

Sekundärantikörpern angefärbt werden („Nachdekoration“). Hierzu wurde in gleicher Weise wie bei der Färbung mit der ersten Antikörper-Kombination verfahren.

3.2.4.5. Streptavidin-Chromatographie

Zur Isolation der biotinylierten Proteine aus den Ganzzelllysaten des *Proximity Labelling* (siehe Abschnitt 3.2.3.10) wurde eine Streptavidin-Chromatographie durchgeführt. Dazu wurden die gewonnenen Lysate auf Eis aufgetaut, anhand der Probe mit der geringsten Proteinkonzentration die maximale Lademenge bestimmt und die Konzentrationen mit Lysepuffer (APEX) folglich auf 4 mg/ml bei einem Endvolumen von 1,5 ml eingestellt. Von jeder Probe wurden nun 20 µl des Ganzzelllysates („Totals“) entnommen. Daraufhin wurden die Streptavidin Sepharose *Beads* vorbereitet, indem je 50 µl 50% Streptavidin Sepharose *Beads* (GE Healthcare) in eine Säule (MoBiTec) pipettiert wurden. Die Säulen wurden nun für 1 min bei 200 x *g* abzentrifugiert. Alle Waschschrte wurden nachfolgend identisch für 1 min und bei 200 x *g* durchgeführt. Der Durchfluss wurde daraufhin verworfen und die *Beads* mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die *Beads* zur Äquilibration zweimal mit Lysepuffer (APEX) gewaschen. Nun wurden die auf 4 mg/ml eingestellten Lysate zu den vorbereiteten *Beads* gegeben und für 60 min bei RT auf dem Rolltaumler inkubiert. Darauf folgte eine Abzentrifugation der *Beads* für 1 min bei 300 x *g*. Der Überstand wurde entnommen und davon jeweils 20 µl als ungebundene Proteinfraction („Unbounds“) abgenommen. Die *Beads* wurden als nächstes 10 x mit je 0,5 ml Lysepuffer (APEX) und 5 x mit je 0,5 ml Urea-Waschpuffer gewaschen. Dann wurden zwei weitere Waschschrte mit 1 ml Urea-Waschpuffer durchgeführt, wobei dem Puffer 10 µl 5 mM Biotin pro ml zugesetzt wurde. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde dabei für 2 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit je 30 µl 1 x Laemmli-Probenpuffer mit 2 mM Biotin für 5-10 min bei 95°C in Eppendorfgefäße eluiert. Der Elutionsschritt wurde wiederholt. Als letztes wurde zu allen entnommenen Proben („Totals“ und „Unbounds“) jeweils 30 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer zugegeben und diese bei -20°C eingefroren. Alles übrige Probenmaterial einschließlich der „Eluate“ (isolierte ziliäre Proteine) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Analyse der mittels Streptavidin-Chromatographie gewonnenen Proben schloss sich eine SDS-PAGE an. Dabei wurden jeweils 60 µg der „Totals“- und „Unbounds“-Proben sowie 2,4 mg der „Eluate“ geladen. Anschließend folgte eine Western Blot-basierte, vergleichende Analyse der zu untersuchenden Proteine in den unterschiedlichen Fraktionen.

3.2.5. Bioinformatische Methoden

3.2.5.1. Quantifizierung von Proteinmengen im Western Blot

Die Bandenintensitäten der im Western Blot detektierten Proteine wurden mit Hilfe der Software „Image Studio Lite 2“ von LI-COR Biosciences® quantifiziert. Dabei diente das Haushaltsgen β -Aktin als Ladekontrolle zur Normierung der geladenen Proteinmengen.

3.2.5.2. Messung der Zilienlängen und Quantifizierung ziliärer Proteinlevel in Immunfluoreszenz-Aufnahmen

Zur Auswertung von immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde die gemeinfreie Software „Fiji“ verwendet [78]. Zur Messung der Zilienlänge wurde mit Hilfe des Zilienmarkers Arl13b eine segmentierte Linie zur Selektion eines Ziliums gezogen und diese vermessen. Zur Quantifizierung eines ziliären Proteinlevels wurde mit Hilfe des Zilienmarkers acetyliertes Tubulin eine segmentierte Linie zur Selektion eines Ziliums gezogen und die mittlere Intensität des Fluoreszenzsignals in diesem Bereich gemessen. Wie im Folgenden beschrieben wurde hierbei je nach untersuchtem Kandidatenprotein bezüglich der Normalisierung unterschiedlich verfahren. Bei Arl13b wurde das gemessene Fluoreszenzsignal auf das Signal des Zilienmarkers acetyliertes Tubulin normalisiert. Bei Ift88 wurde ebenfalls auf das Signal des Zilienmarkers acetyliertes Tubulin normalisiert, allerdings wurde hier durch zusätzliche Färbung des Basalkörpers mit γ -Tubulin nur das ziliäre Proteinlevel distal des Basalkörpers quantifiziert. Das gemessene Signal von Fam92a1 wurde auf das Fluoreszenzsignal des intrazellulären Hintergrundes der jeweiligen Zelle normalisiert. Bei der Quantifizierung des CEP290-Interaktionspartners Pcm-1 an der ziliären Basis und einem Großteil der Zelle wurde aufgrund der relativ großen Flächen keine gesonderte Normalisierung der Fluoreszenzsignale vorgenommen.

3.2.5.3. Statistik

Zur Analyse der statistischen Signifikanzniveaus der quantifizierten, ziliären Proteinlevel und der gemessenen Zilienlängen wurde der Bonferroni-Test mittels der Software „GraphPad PRISM 6®“ angewendet. Der Bonferroni-Test eignet sich zum multiplen Vergleich von Mittelwertpaaren bei Varianzinhomogenität und ungleichen Stichprobenumfängen. Die Signifikanzniveaus wurden bei der statistischen Analyse wie folgt definiert:

*** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

4. Ergebnisteil

4.1. Generierung und Validierung unterschiedlicher CEP290-Zelllinien

Proteine der Transitions-Zone des Ziliums sind bei Ziliopathien immens häufig von Mutationen betroffen [81] und führen zu einer Dysfunktion der in wichtige Signalwege involvierten und für die ziliäre Homöostase essentiellen ziliären Barriere [32,34,60]. Als zentrale Komponente dieser Diffusionsbarriere ist das Transitions-Zonen-Protein CEP290 (*Centrosomal protein of 290 kDa*) bei der Pathogenese von entscheidender Bedeutung [7,81]. Mutationen in *CEP290* führen dabei in Bezug auf Schweregrad und Organbeteiligungen zu extrem unterschiedlichen Krankheitsbildern [4,57,88] und gerade im Laufe der letzten Jahre konnten zahlreiche dieser Mutationen in Patienten identifiziert werden, welche in einer Datenbank veröffentlicht wurden [17].

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit bestand somit darin, stabile Zelllinien auf Basis einer *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie zu generieren und zu validieren, welche unterschiedliche CEP290-Varianten mit einem LAP-tag primär zur Lokalisierung exprimieren sollten. Die Selektion der Mutationen in *CEP290* basierte, wie bereits in der Einleitung ausführlich erörtert, auf der Diversität der Symptomatik sowie der durch die Mutation betroffenen Genbereiche, auf Grundlage der *CEP290base* [17]. Ausgewählt für eine nähere Charakterisierung wurden infolge dessen eine *missense*-Mutation (Trp7Cys), eine *frameshift*-Mutation (Leu1141PhefsX5) sowie die beiden *nonsense*-Mutationen Glu1902X und Gln1942X. Durch eine anschließende Untersuchung der verschiedenen CEP290-Zelllinien sollten so zum einen weitere Erkenntnisse über die Pathogenese von CEP290-assoziierten Ziliopathien gewonnen und zum anderen die ziliäre Barriere und insbesondere einer seiner Hauptkomponenten, CEP290, näher untersucht werden.

4.1.1. Klonierung und ortsgerichtete Mutagenese von humanem CEP290

Der erste Schritt der Arbeit bestand nunmehr darin, die selektierten Mutationen mittels ortsgerichteter Mutagenese in humanes *CEP290* einzubringen. Als Basis für die Mutagenese diente dabei das Plasmid pENTR223.1_humanCEP290iso1, welches auf einem für die anschließende Gateway-Klonierung (Invitrogen) essentiellen, so genannten *Entry*-Vektor beruht. Dieses wurde als *Template* nach einem Protokoll von Edelheit *et al.* in Reaktionen eingesetzt, bei der selbst designte, vollständig überlappende Primer-Paare zur ortsgerichteten Mutagenese von *CEP290* zum Einsatz kamen [27]. Die entstandenen Produkte wurden anschließend in kompetente *E. coli* (MACH1™) transformiert und die

generierten Klone mittels Restriktionsverdau mit *XbaI* überprüft. Anhand dessen konnten jeweils positive Klone für alle Mutationen identifiziert werden, woraufhin diese zur Sequenzierung mit extra entworfenen Sequenzierprimern geschickt wurden, die das gesamte *CEP290*-Gen abdeckten. Somit konnten für alle vier *CEP290*-Varianten erfolgreich Klone identifiziert werden, die auch keine weitere, zufällige Mutation aufwiesen. Von diesen verifizierten Klonen wurden schließlich Kryokulturen angelegt. Die Erfolgsrate bei der Mutagenese lag mit diesem Protokoll bei etwa 67% aller gepickten Klone.

Der nächste Schritt bestand aus der Klonierung der vier erfolgreich generierten *CEP290*-Varianten und der als Kontrolle dienenden wildtypischen Variante in einen für Säugerzellen geeigneten Expressionsvektor. Dazu wurde der *Destination*-Vektor pEF5B/FRT/LAP-DEST ausgewählt [84], welcher sich durch einen schematisch in Abbildung 6 dargestellten vor der LR-Rekombinationsstelle gelegenen *LAP-tag* (*Localisation and Affinity Purification tag*) auszeichnet. Der *LAP-tag* besteht zum einen aus einem *enhanced GFP* (*EGFP*), einer optimierten GFP (Grün fluoreszierendes Protein)-Variante, welche zur intrazellulären Lokalisierung des Proteins, in dem Fall *CEP290*, diente. Zum anderen ist eine TEV (*Tobacco Etch Virus*)-Protease-Schnittstelle zwischen dem *EGFP* und dem *S-tag* des *LAP-tags* inseriert, die eine gezielte Abspaltung des fluoreszenten Proteins ermöglicht. Somit besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass an einen *LAP-tag* fusionierte Protein nach Verdau mit der TEV-Protease zu detektieren. Darüber hinaus zeichnet sich der gewählte *Destination*-Vektor durch eine FRT (*FLP recognition target*)-Stelle zur selektiven Integration in das Genom eines Organismus aus, welches ebenfalls eine spezifisch ins Genom integrierte FRT-Stelle, einen so genannten *FlpIn*-Locus, besitzt. Zur Selektion in Säugerzellen codiert der *Destination*-Vektor zudem für das Antibiotikum Hygromycin B. Das Resistenzgen wird dabei nur abgelesen, wenn das Konstrukt in korrekter Orientierung in den *FlpIn*-Locus inseriert worden ist, da es über kein autonomes Startcodon verfügt.

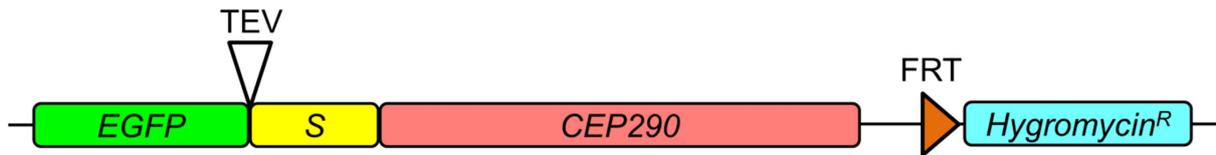


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Expressions-Vektors pEF5B/FRT/LAP-hCEP290 mit der Lokalisation der am 5'-Ende an einen LAP-tag (*Localisation and Affinity Purification tag*) fusionierten CEP290-Variante. Am 5'-Ende ist dabei *enhanced GFP (EGFP)*, die TEV (*Tobacco Etch Virus*)-Protease-Schnittstelle sowie der S-tag gelegen, danach folgt die jeweilig integrierte CEP290-Variante und am 3'-Ende das Resistenzgen gegen Hygromycin B (*Hygromycin^R*) sowie die FRT (*FLP recognition target*)-Stelle zur selektiven Integration ins Genom. Die Größen der einzelnen Elemente sind zwecks besserer Übersichtlichkeit nicht im tatsächlichen Verhältnis zueinander dargestellt.

Für die Klonierung kam das Gateway-Klonierungsverfahren zum Einsatz, was auf einer LR-Rekombinase-Reaktion basiert und die simple Überführung der vier erzeugten CEP290-Varianten und der wildtypischen Variante aus dem *Entry*- in den *Destination*-Vektor ermöglichte. Dabei wurden die gewonnenen Reaktionsprodukte anschließend in *E. coli* (MACH1™) transformiert und die erzeugten Klone mit Hilfe eines Restriktionsverdaus validiert. Die Gateway-Klonierung erwies sich dabei als höchst effizient, da bei 9 von 10 analysierten Klonen eine erfolgreiche Klonierung nachgewiesen werden konnte und somit alle CEP290-Varianten erfolgreich in den *Destination*-Vektor überführt werden konnten.

4.1.2. Generierung stabiler Zelllinien mit den erzeugten CEP290-Varianten auf Basis einer *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie

Nachdem die Mutagenese des humanen CEP290 sowie die anschließende Gateway-Klonierung in einen für Säugerzellen geeigneten *Destination*-Vektor erfolgreich waren, umfasste der folgende Teil der Arbeit die Generierung von stabilen Zelllinien mit den unterschiedlichen CEP290-Varianten auf Basis einer *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie. Die Wahl auf eine IMCD3-Zelllinie zur Untersuchung der CEP290-Varianten fiel hierbei aus mehreren Gründen. Zum einen handelt es sich bei dieser um eine Zelllinie aus der Maus, welche einen zum menschlichen Organismus sehr vergleichbaren Modellorganismus darstellt. Zum anderen stammen IMCD3-Zellen aus dem inneren medullären Sammelrohr der Niere [71], weswegen sie sich insbesondere zur Studie des häufigsten Manifestationsortes aller Ziliopathien, der Niere, eignen [89]. Daneben wurden bereits in der Vergangenheit *knockout*-IMCD3-Zelllinien genutzt, um Ziliopathien zu untersuchen [53,56], weshalb sie sich als etablierte Zelllinie zur Analyse der ausgewählten CEP290-assoziierten Ziliopathien anbot. In der AG Nachury (Stanford, USA) wurde vorangehend eine *FlpIn*-IMCD3-Zelllinie generiert,

welche einen *FlpIn*-Locus auf Chromosom 6 besitzt. Darauf basierend wurde dann ebenfalls in dieser AG erfolgreich eine *Cep290*^{-/-}-Zelllinie etabliert. In den *FlpIn*-Locus dieser generierten Zelllinie kann durch Rekombination gezielt Plasmid-DNA inseriert werden. Somit war es möglich, die in dem jeweiligen Expressions-Vektor enthaltene *CEP290*-Variante in das Genom der *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie einzubringen.

Im Folgenden sollten die *CEP290*-Varianten nun mittels zweier unterschiedlicher Transfektionsansätze, *forward* und *reverse*, und gleichzeitiger Kotransfektion einer Rekombinase (pOG44) selektiv in den *FlpIn*-Locus der *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie inseriert werden. Da IMCD3-Zellen generell schwierig zu transfizieren sind, wurden direkt beide Verfahren erprobt, um möglichst effizient stabile Klone zu erzeugen. Etwa 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf größere Schalen umverteilt und nochmals etwa nach der gleichen Zeitspanne mit der Selektion durch die Zugabe von Hygromycin B begonnen. Überlebende Klone wurden anschließend unter Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes vereinzelt. Hierbei zeigte sich, dass nur wenige Klone final überlebten und folglich den Expressions-Vektor mit der entsprechenden *CEP290*-Variante erfolgreich ins Genom inseriert hatten. Daher wurden weitere Transfektionsansätze durchgeführt, wobei die Menge an Transfektionsreagenz erhöht und mit der Hygromycin-Selektion bereits unmittelbar im Anschluss an die Umverteilung der Zellen in größere Schalen begonnen wurde. Letztendlich konnten so mindestens zwei stabile Klone für jede *CEP290*-Variante generiert werden, außer für die wildtypische Variante, bei der lediglich ein Pool von Klonen gewonnen werden konnte. Von allen erzeugten Klonen wurden hierbei Kryokulturen angelegt.

Zur genaueren Bezifferung der offenbar sehr niedrigen Transfektionseffizienz der *CEP290*-Varianten in die *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie wurden zudem transiente, *reverse* Transfektionen in wildtypische IMCD3- und RPE (humane Retinapigmentepithel)-Zelllinien durchgeführt [21]. Dabei wurden die wildtypische *LAP-CEP290*-Variante und das Kontrollkonstrukt *PKA-R1α-GFP*, eine an GFP fusionierte regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A [9], transfiziert. Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz wurden die transfizierten Zellen anschließend mittels Immunfluoreszenz dahingehend analysiert, ob ein korrekt lokalisierendes, grün fluoreszierendes Signal in den Zellen detektiert werden konnte. Für *LAP-CEP290*^{WT} sollte dieses in der Transitions-Zone und für *PKA-R1α-GFP* am Basalkörper [87] lokalisiert sein, was durch eine Färbung mit einem gegen acetyliertes Tubulin gerichteten Antikörper bestimmt werden sollte. Als Resultat ergab sich eine für beide Konstrukte deutlich erniedrigte Transfektionsrate in WT-IMCD3-Zellen, die für *LAP-CEP290*^{WT} mit circa 2% noch niedriger als für *PKA-R1α-GFP* lag, welches eine Rate von etwa 8% aufwies. Eine Transfektionsrate von maximal 2% ergab sich auch bei den stabilen Transfektionen der *CEP290*-Varianten in die *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie, basierend auf der

Auswertung gleichzeitig angefertigter Immunfluoreszenzen der Transfektionsansätze. Dahingegen konnte in RPE-Zellen eine geschätzte Transfektionseffizienz von ungefähr 15% für *LAP-CEP290^{WT}* bzw. 40% für *PKA-R1 α -GFP* ermittelt werden, demnach bedeutend höhere Raten.

4.1.3. Validierung der erzeugten CEP290-Klone und Bestimmung der Expressionslevel der CEP290-Varianten

4.1.3.1. Verifizierung eines geeigneten Antikörpers zur Detektion der LAP-getaggten CEP290-Varianten mittels Western Blot

Als nächster, wichtiger Teil dieser Arbeit folgte die Validierung der generierten stabilen CEP290-Zelllinien mittels SDS-PAGE und Western Blot, wobei die errechneten molekularen Massen der unterschiedlichen CEP290-Varianten in Tabelle 13 aufgeführt sind und zwischen circa 178 kDa und 320 kDa liegen.

Tabelle 13: Übersicht über die molekularen Massen der LAP-getaggten CEP290-Varianten. Angaben in kDa. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des „Protein Mass Calculator“ (Promega).

CEP290-Variante	Molekulare Masse [kDa]
LAP-CEP290 ^{WT}	~320
LAP-CEP290 ^{W7C}	~320
LAP-CEP290 ^{E1902X}	~240
LAP-CEP290 ^{Q1942X}	~244
LAP-CEP290 ^{L1141FfsX5}	~178

Zur Validierung musste zunächst ein geeigneter Antikörper identifiziert werden, der die an einen LAP-*tag* fusionierten, humanen CEP290-Varianten in einem Western Blot detektieren konnte. Der Fokus lag hierbei als Erstes auf der Detektion des LAP-*tags*, der entweder mittels Antikörper gegen das GFP oder den S-*tag* in den erzeugten CEP290-Zelllinien erkennbar gemacht werden sollte. Zunächst wurde hierzu ein in der AG Nachury (Stanford, USA) hergestellter gegen GFP gerichteter Antikörper getestet. Ganzzelllysate der WT-, *Cep290*^{-/-}- sowie der erzeugten *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie und vier exemplarisch ausgewählter Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}-Zelllinie wurden hergestellt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot mit diesem anti-GFP Antikörper analysiert (Abbildung 7). Der erfolgreiche Proteintransfer vom Tris-Acetat-Gel auf

die PVDF-Membran konnte dabei vorangehend mit Hilfe einer Coomassie-Färbung verifiziert werden. Als Ergebnis des Western Blots zeigte sich ein unspezifisches Bandenmuster, welches in allen Lysaten sichtbar war. Lediglich in der WT- und der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie konnte noch eine zusätzliche, schwache Bande bei etwa 230 kDa ausgemacht werden, die jedoch ebenso unspezifisch war, da diese Zelllinien keinerlei GFP exprimierten. Folglich eignete sich der verwendete anti-GFP Antikörper nicht zur Detektion der CEP290-Varianten.

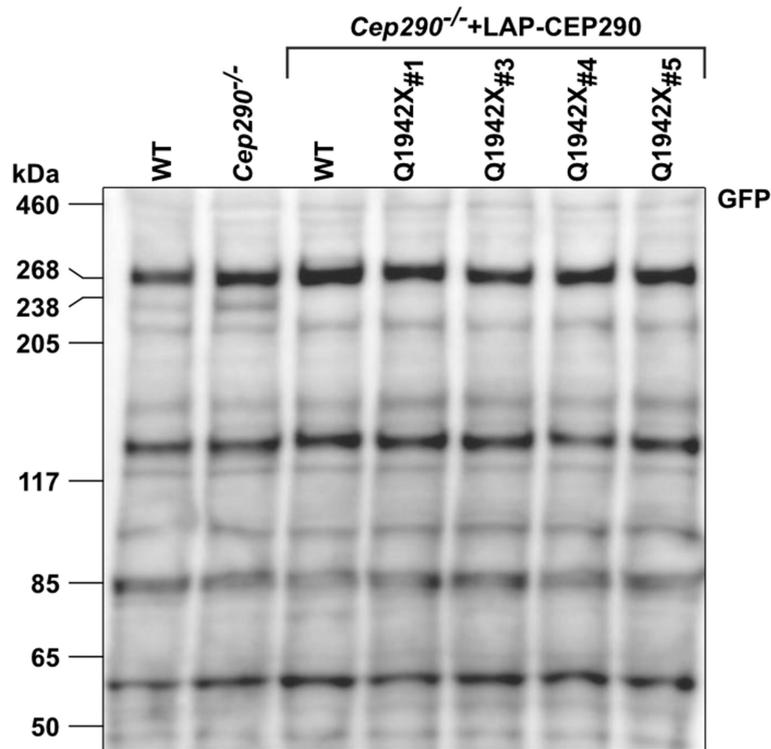


Abbildung 7: Ganzzelllysate der Zelllinien WT, *Cep290*^{-/-}, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT} und vier Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}-Zelllinie wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit dem aus der AG Nachury (Stanford, USA) stammenden anti-GFP Antikörper analysiert. Es wurde hierbei ein 3-8% Tris-Acetat-Gel verwendet und die für hohe Molekulargewichte geeignete „HiMark“ Proteinleiter (Invitrogen) aufgetragen.

Im Folgenden sollten nun zwei weitere gegen den LAP-*tag* gerichtete Antikörper hinsichtlich ihrer Tauglichkeit zur Validierung der CEP290-Zelllinien untersucht werden: Zum einen ein alternativer anti-GFP Antikörper der Firma Roche und zum anderen ein anti-S-*tag* Antikörper. Als Positivkontrolle diente hier ein bereits vorhandenes Ganzzelllysate einer WT+MKS1-LAP-IMCD3-Zelllinie, welche in der AG Mick etabliert wurde (May und Mick, unveröffentlicht). Diese Zelllinie exprimiert das an einen LAP-*tag* fusionierte MKS1, welches ein Bestandteil des großen MKS-Proteinkomplex der Transitions-Zone ist [51]. Das MKS1-LAP-Fusionsprotein weist dabei eine molekulare Masse von circa 91 kDa auf. Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnten beide Antikörper das Fusionsprotein in der Positivkontrolle im korrekten

Größenbereich detektieren, auch wenn der anti-S-tag Antikörper noch eine zweite, distinkte Bande bei etwa 70 kDa erkannt hatte. Dahingegen konnten in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie und der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}- bzw. *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#1-Zelllinie bei beiden Antikörpern keine bzw. nur schwache, unspezifische Banden identifiziert werden. Daher konnten auch der alternative anti-GFP Antikörper sowie der anti-S-tag Antikörper nicht zur Validierung der generierten CEP290-Zelllinien eingesetzt werden.

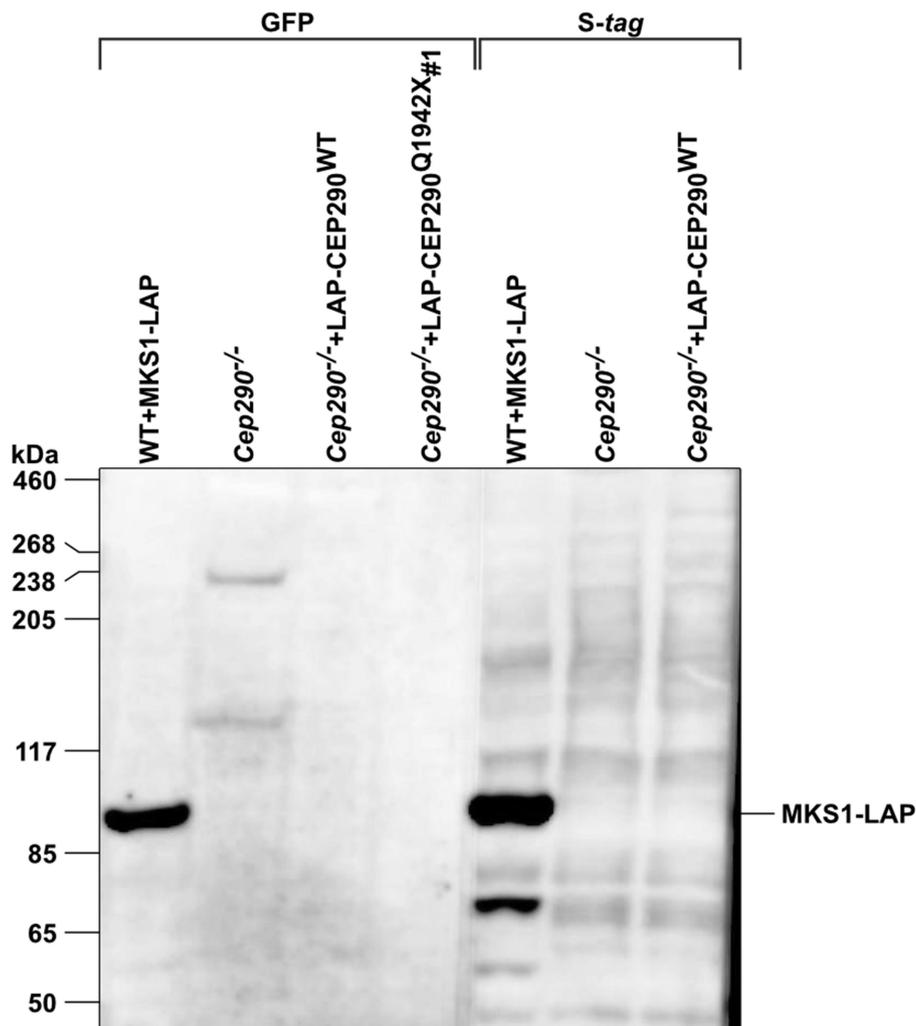


Abbildung 8: Ganzzelllysate der Zelllinien WT+MKS1-LAP, *Cep290*^{-/-}, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT} bzw. *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X} Klon 1 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit gegen GFP (Roche AG) und S-tag gerichteten Antikörpern analysiert. Es wurden hierzu ein 3-8% Tris-Acetat-Gel und die „HiMark“ Proteinleiter (Invitrogen) verwendet.

Da im vorangegangenen Teil der Arbeit kein gegen den LAP-tag gerichteter Antikörper validiert werden konnte, mit welchem die an einen LAP-tag fusionierten CEP290-Varianten sicher hätten detektiert werden können, wurde nun eine andere Strategie zur Detektion der Varianten gewählt. Dabei wurde ein Antikörper gegen das Protein CEP290 selber getestet,

welcher gegen humanes CEP290 gerichtet war. Hierzu wurden Ganzzelllysate der Zelllinien *Cep290*^{-/-} und *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{WT} hergestellt sowie bereits vorhandenes Ganzzelllysate der Zelllinie WT+MKS1-LAP herangezogen, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot nach Inkubation mit dem gegen humanes CEP290 gerichteten Antikörper analysiert (Abbildung 9). Hierbei erkannte der Antikörper in der *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie eine distinkte Bande bei etwa 320 kDa, die in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie nicht detektiert werden konnte, wenngleich in beiden Zelllinien auch weitere unspezifische Banden vor allem im niedermolekularen Bereich sichtbar waren. Darüber hinaus konnte der humane CEP290 Antikörper höchstwahrscheinlich auch das murine, wildtypische Cep290 im Lysat der WT+MKS1-LAP-Zelllinie erkennen, welches bei 290 kDa als höher laufendes Segment einer Doppelbande identifiziert werden konnte. Daneben zeigte sich in der WT+MKS1-LAP-Zelllinie ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster im niedermolekularen Bereich verglichen mit der *Cep290*^{-/-}- und *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie, was auf eine andere Lysatherstellung zurückzuführen war. Dementsprechend konnte der gegen humanes CEP290 gerichtete Antikörper schließlich als probates Mittel zur Validierung der CEP290-Zelllinien herausgearbeitet werden, da dieser humanes (als auch murines) CEP290 in Form einer distinkten Bande in der verwendeten IMCD3-Zelllinie detektieren konnte.

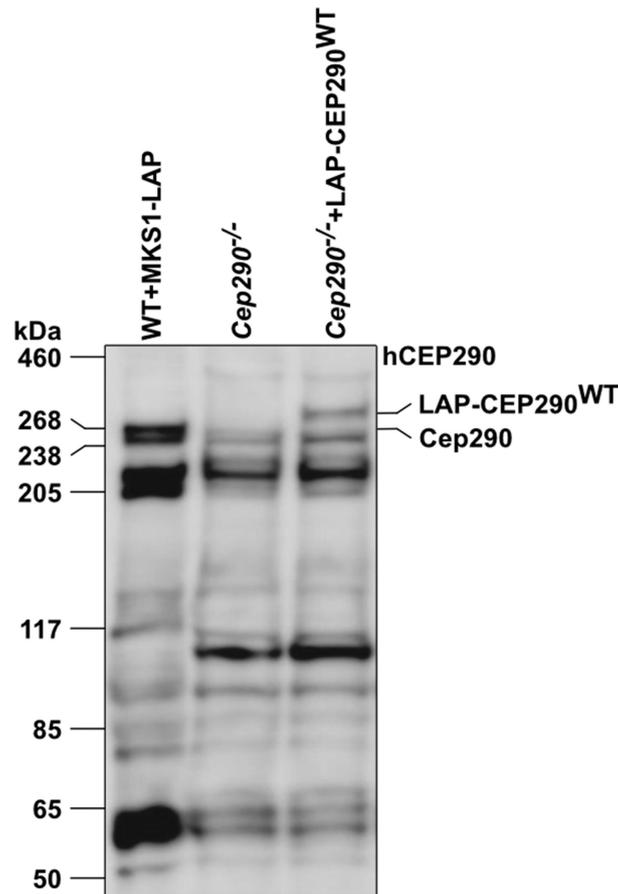


Abbildung 9: Ganzzelllysate der Zelllinien WT+MKS1-LAP, *Cep290*^{-/-} und *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT} wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit gegen humanes CEP290 gerichtetem Antikörper analysiert. Es wurden hierzu ein 3-8% Tris-Acetat-Gel und die „HiMark“ Proteinleiter (Invitrogen) verwendet.

4.1.3.2. Validierung der erzeugten CEP290-Klone mittels des anti-hCEP290 Antikörpers und Bestimmung der Proteinlevel der CEP290-Varianten

Die erfolgreiche Verifizierung des zur Detektion der CEP290-Varianten geeigneten Antikörpers, anti-hCEP290, ermöglichte als nächstes die Validierung der erzeugten CEP290-Zelllinien. Dazu wurden Ganzzelllysate von allen erzeugten CEP290-Zelllinien, der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie sowie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie angefertigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot mit dem anti-hCEP290 Antikörper bzw. zur Ladekontrolle mit dem anti- β -Aktin Antikörper analysiert (Abbildung 10). Der anti- β -Aktin Antikörper erkannte in allen Proben das etwa 42 kDa große Haushaltsprotein β -Aktin mit vergleichbarer Stärke, wodurch auf gleichmäßige Lademengen der Lysate geschlossen werden konnte. In der WT-IMCD3-Zelllinie wurde eine distinkte Bande bei etwa 290 kDa vom anti-hCEP290 Antikörper erkannt, was exakt der molekularen Masse von wildtypischem CEP290 entsprach. Demgegenüber konnte in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie keine Bande in dieser Größe erkannt werden.

Alle LAP-getaggten CEP290-Zelllinien wiesen, mit Ausnahme der Klone mit der L1141FfsX5 Mutation, der kalkulierten molekularen Masse der CEP290-Varianten (Tabelle 13) entsprechende Banden auf, wenngleich auch mit deutlich unterschiedlichen Intensitäten. Demgemäß konnten für die Klone von *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT} und *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C} Banden bei etwa 320 kDa detektiert werden, wobei Klon 5 trotz leicht erniedrigtem β -Aktin-Signal die stärkste Bande zeigte. Bei den beiden Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}-Zelllinie erkannte der anti-hCEP290 Antikörper ähnlich starke Signale bei circa 240 kDa. Die Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}-Zelllinie wiesen jeweils Banden auf, die bei einer geringfügig höheren molekularen Masse als bei den Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}-Zelllinie lagen, passend zu einer theoretischen Differenz von 4 kDa. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede in der Intensität der Banden, da Klon 2 trotz vergleichsweise starkem β -Aktin-Signal nur eine äußerst schwache Bande aufwies. Im Gegensatz dazu konnte in beiden Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie kein mit der berechneten Masse von 178 kDa übereinstimmendes Signal im Western Blot detektiert werden. Ferner zeigten alle Spuren bei dem verwendeten anti-hCEP290 Antikörper ein vergleichbares, unspezifisches Bandenmuster im niedermolekularen Bereich.

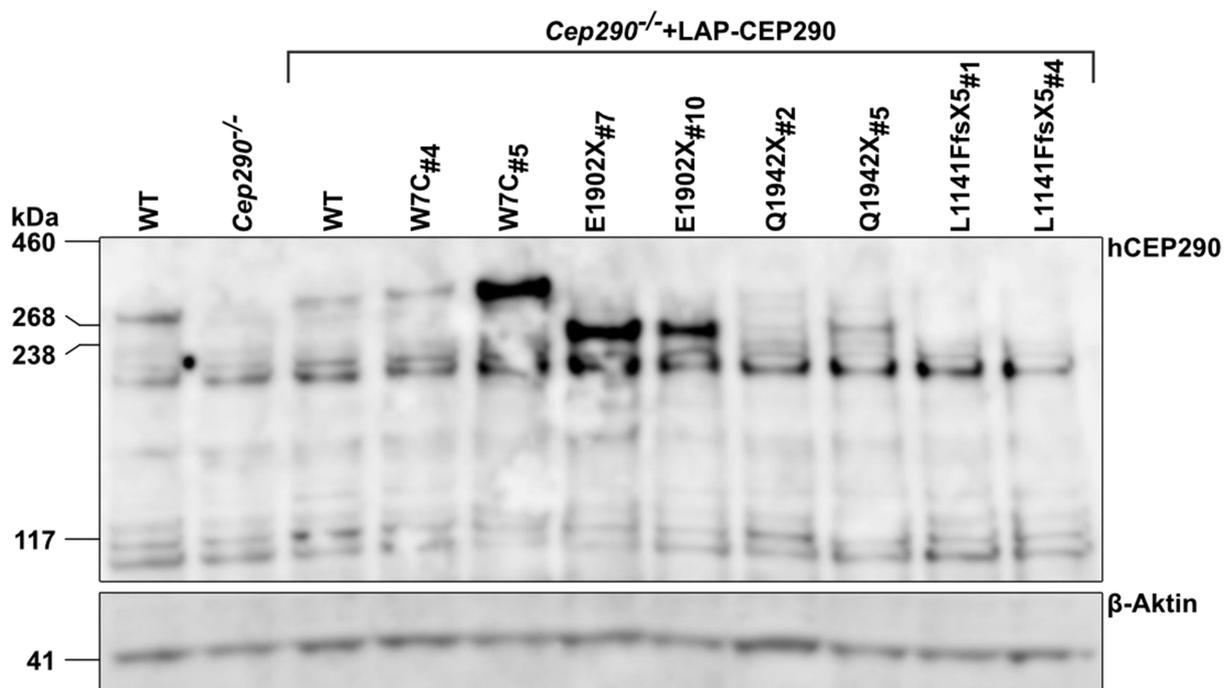


Abbildung 10: Ganzzelllysate der Zelllinien WT, *Cep290*^{-/-} sowie *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C} Klon 4+5, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X} Klon 7+10, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X} Klon 2+5 und *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5} Klon 1+4 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit Antikörpern gegen humanes CEP290 bzw. β -Aktin als Ladekontrolle analysiert. Es wurden hierzu ein 3-8% Tris-Acetat-Gel und die „HiMark“ Proteinleiter (Invitrogen) verwendet.

Um die im Western Blot deutlich sichtbaren Unterschiede in den Proteinleveln der CEP290-Varianten zu quantifizieren, schloss sich eine softwaregestützte Bestimmung der Bandenintensitäten an. Hierbei wurde die Intensität der Bande der CEP290-Variante jeweils auf das als Ladekontrolle fungierende β -Aktin der jeweiligen Probe normiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 11 gezeigt, wobei es sich um relative Intensitäten der CEP290-Varianten handelt, welche auf das Level der Expression der LAP-CEP290^{WT}-Variante normiert worden sind. Offensichtlich gab es dabei enorme Unterschiede in der intrazellulären Abundanz der verschiedenen Varianten von CEP290. So zeigte sich das im Lysat detektierte Level der CEP290-Variante in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie im Vergleich zu wildtypisch exprimierten *Cep290* um etwa 40% verringert. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Klonen einer CEP290-Variante konnte dahingegen nur bei den beiden Klonen der CEP290-Zelllinie mit der *missense*-Mutation W7C ermittelt werden, die bei Klon 4 etwa der 1,3fachen Menge der Expression der LAP-CEP290^{WT}-Variante entsprach, bei Klon 5 jedoch etwa 17fach erhöht war. In der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}-Zelllinie zeigte sich im Gegensatz dazu für beide Klone dieselbe Abundanz der CEP290-Variante, die verglichen mit der Expression der LAP-CEP290^{WT}-Variante bei der 6fachen Menge lag. Klon 5 der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}-Zelllinie zeigte ein um etwa 20% höheres Proteinlevel der CEP290-Variante verglichen mit der LAP-CEP290^{WT}-Variante, wohingegen in Klon 2 eine kaum detektierbare Menge der CEP290-Variante, mit einer relativen Intensität von lediglich 0,1 ermittelt wurde. Die im Western Blot nicht erkannten CEP290-Varianten mit der L1141FfsX5 Mutation wurden in diesem Rahmen demzufolge nicht analysiert.

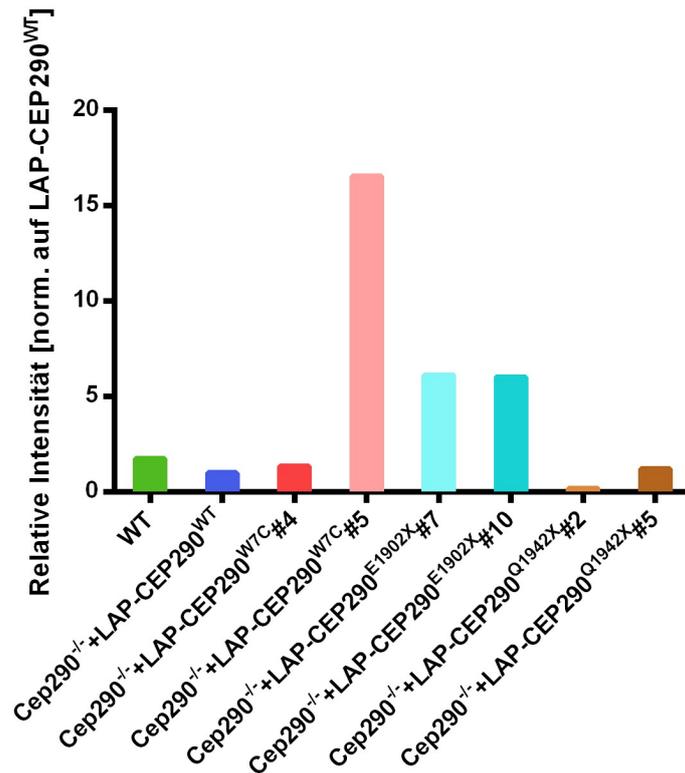


Abbildung 11: Quantifizierung der Proteinlevel der CEP290-Varianten in den angezeigten Zelllinien, basierend auf dem in Abbildung 10 dargestellten Western Blot. Vorangehend erfolgte eine Normierung der geladenen Lysatmengen mittels einer β -Aktin Ladekontrolle. Hier abgebildet sind die auf die LAP-CEP290^{WT}-Variante normierten, relativen Intensitäten des wildtypisch exprimierten Cep290 sowie der mutierten CEP290-Varianten in den untersuchten Klonen.

4.1.3.3. Validierung der erzeugten CEP290-Klone mittels anti-hCEP290 und Bestimmung der Proteinlevel der CEP290-Varianten unter Zugabe eines Proteasom-Inhibitors

Im Folgenden sollte im Rahmen einer Wiederholung des Ansatzes zur Validierung der CEP290-Zelllinien getestet werden, ob die nicht detektierbaren CEP290-Varianten der beiden untersuchten Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie möglicherweise instabil sind. Daneben sollten auch potentiell verminderte Proteininstabilitäten der anderen mutierten CEP290-Varianten durch Hemmung der proteasomalen Degradation aufgedeckt werden. Insbesondere bei der LAP-CEP290^{Q1942X}-Variante wurde aufgrund der ermittelten niedrigen Expressionslevel eine Instabilität des Proteins vermutet. Zur Hemmung der proteasomalen Degradation wurde 5 Stunden vor der Herstellung der Ganzzelllysate der Proteasom-Inhibitor MG132 zu den Zellkulturen der Zelllinien mit den mutierten CEP290-Varianten (W7C, E1902X, Q1942X, L1141FfsX5) gegeben. Folglich sollten die Proteinlevel der CEP290-Varianten aller mutierten CEP290-Zelllinien so signifikant ansteigen, dass diese für alle Konstrukte oberhalb der Nachweisgrenze des eingesetzten anti-hCEP290

Antikörpers liegen sollten. Als Ladekontrolle für die folgende Quantifizierung wurde ebenfalls β -Aktin angefärbt, welches in allen Lysaten mit vergleichbarer Stärke bei etwa 42 kDa sichtbar wurde (Abbildung 12). Folglich konnte von kongruenten Lademengen zwischen den Proben ausgegangen werden. Die weitere Auswertung des in Abbildung 12 gezeigten Western Blots ergab vergleichbare Ergebnisse zu dem zuvor durchgeführten Western Blot ohne die Zugabe von MG132, da bei allen bereits als positiv identifizierten CEP290-Zelllinien erneut distinkte Banden für die CEP290-Varianten mit den korrekten Größen ausgemacht werden konnten. Wie erwartet, zeigten einige der Banden dabei allerdings stärkere Intensitäten als im vorangegangenen Western Blot (Abbildung 10), welche nachfolgend noch genauer quantifiziert werden sollten. Ausgenommen hiervon war die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie, welche vor der Lysatherstellung nicht mit MG132 behandelt wurde. Bei der als Negativkontrolle fungierenden *Cep290*^{-/-}-Zelllinie konnte wiederum keine Bande bei 290 kDa erkannt werden. Nichtsdestotrotz konnten für die beiden Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie 1 und 4 erneut keine distinkten Banden bei der erwarteten Größe von etwa 178 kDa detektiert werden. Somit konnten diese beiden Klone auch nicht mit Hilfe der Zugabe von MG132 in einem Western Blot-basierten Ansatz validiert werden.

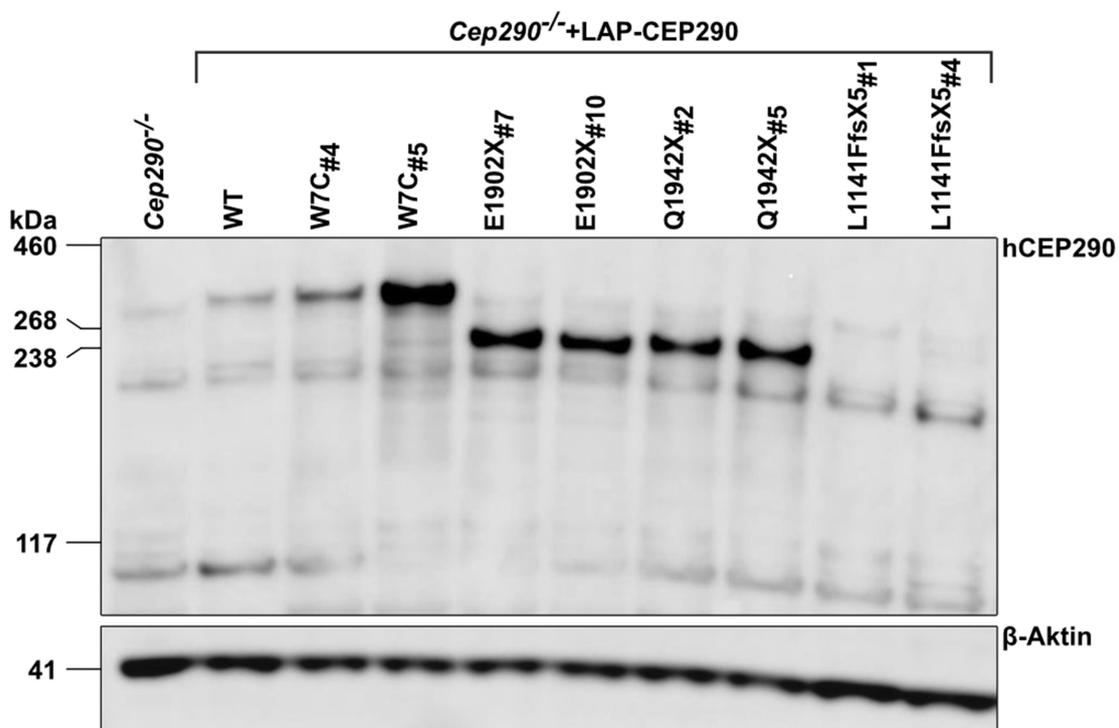


Abbildung 12: Ganzzelllysate der Zelllinien *Cep290*^{-/-} sowie *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C} Klon 4+5, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X} Klon 7+10, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X} Klon 2+5 und *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5} Klon 1+4 wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nach Inkubation mit Antikörpern gegen hCEP290 und β -Aktin als Ladekontrolle analysiert. Es wurden hierzu ein 3-8% Tris-Acetat-Gel und die „HiMark“ Proteinleiter (Invitrogen) verwendet.

An den Western Blot schloss sich wiederum eine Quantifizierung der CEP290-Proteinlevel an, um einerseits die ermittelten, teils drastischen Unterschiede bei der vorangegangenen Quantifizierung zu verifizieren und andererseits durch die Zugabe des Proteasom-Inhibitors Hinweise auf die Proteinstabilität der unterschiedlichen Varianten zu erhalten. Die Normierung erfolgte hier auch auf die wildtypische LAP-CEP290-Variante. Wie in Abbildung 13 dargestellt, ergaben sich hierbei unter Zugabe von MG132 bei vier der sechs untersuchten Klone erhöhte Proteinlevel. Zudem ergab sich erneut ein starker Unterschied zwischen den beiden Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}-Zelllinie. Hierbei zeigte Klon 4 ein etwa doppelt so hohes Proteinlevel der CEP290-Variante als zuvor ohne die Zugabe von MG132, demgegenüber wies Klon 5 jedoch ein niedrigeres Expressionslevel unter Zugabe von MG132 auf. Daneben lagen bei den beiden Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}-Zelllinie wiederum ähnliche Expressionslevel vor und es konnte lediglich bei Klon 7 ein geringfügig höheres Proteinlevel der CEP290-Variante als zuvor ohne die Zugabe von MG132 festgestellt werden. Die beiden Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}-Zelllinie zeigten hier relativ ähnliche Proteinlevel der CEP290-Variante, wobei Klon 2 eine um etwa 44fach und Klon 5 eine um etwa 4fach höhere Menge als ohne die Zugabe des Proteasom-Inhibitors aufwies. Somit zeigte sich bei der LAP-CEP290^{Q1942X}-Variante eine enorme Steigerung des Expressionslevels nach der Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor. Da analog zu den Western Blots ohne die Zugabe des Proteasom-Inhibitors zu den Zelllinien mit den mutierten CEP290-Varianten auch nach Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor keine Banden bei den beiden Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie detektiert werden konnten, war keine Quantifizierung dieser möglich.

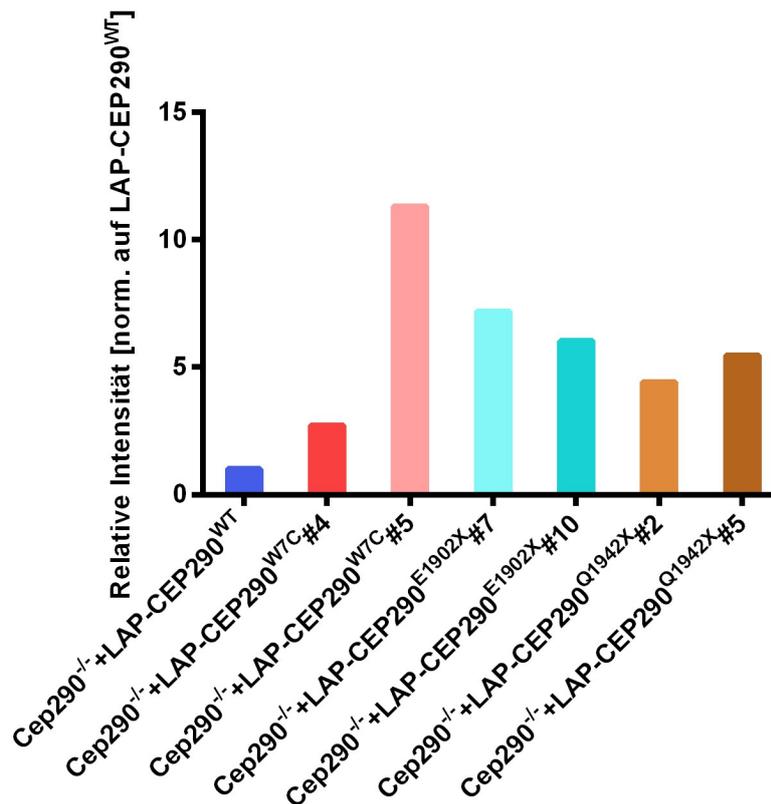


Abbildung 13: Quantifizierung der CEP290-Proteinlevel in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie und den mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelten CEP290-Zelllinien mit den mutierten CEP290-Varianten (W7C, E1902X, Q1942X, L1141FfsX5), basierend auf dem in Abbildung 12 dargestellten Western Blot. Vorgehend erfolgte eine Normierung der geladenen Lysatmengen mittels einer β -Aktin Ladekontrolle und hier abgebildet sind die auf die LAP-CEP290^{WT}-Variante normierten, relativen Intensitäten der mutierten CEP290-Varianten in den untersuchten Klonen.

4.1.3.4. Validierung unspezifischer CEP290-Klone mittels Sequenzierung

Ein weiterer möglicher Ansatz zur Validierung der CEP290-Zelllinien bestand in der Sequenzierung der Klone und sollte vor allem zur noch ausstehenden Validierung der Klone 1 und 4 der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie dienen. Ferner sollte exemplarisch ein bereits verifizierter Klon der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}-Zelllinie sequenziert werden, da zwar die korrekte Größe mit etwa 320 kDa mittels Western Blot verifiziert werden konnte, doch dies auch genau der Größe der LAP-getaggtten wildtypischen CEP290-Variante entsprach. Als Referenz für die Sequenzierung sollte zudem die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie mitgeführt werden, ebenso wie die *Cep290*^{-/-}-Zelllinie als Negativkontrolle für die vorangehend notwendige PCR-Amplifikation. Hierzu wurden jeweils zwei spezifische Primerpaare designt, eines zur Amplifikation des 5'-Bereichs von *hCEP290*, welches die W7C Mutation flankierte, und ein zweites zur Amplifikation eines die L1141FfsX5 Mutation flankierenden Bereiches. Danach wurde eine Kit-basierte Isolation der genomischen DNA aus den genannten Zelllinien vorgenommen. Anschließend wurde die isolierte DNA der

Zelllinien *Cep290*^{-/-}, *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{WT} und *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{W7C} Klon 4 mit dem ersten, im 5'-Bereich bindenden Primerpaar in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Daneben wurde die isolierte DNA von *Cep290*^{-/-} und die der beiden Klone der Zelllinie *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{L1141FfsX5} mit dem zweiten Primerpaar in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Anschließend erfolgte die Überprüfung einer spezifischen Amplifikation durch eine gelelektrophoretische Auftrennung einer Probe der PCR-Produkte (Abbildung 14). Hierbei konnte in der als Negativkontrolle dienenden *Cep290*^{-/-}-Zelllinie weder für das erste, im 5'-Bereich noch für das zweite im humanen *CEP290* anlagernde Primerpaar die Bildung eines Fragmentes beobachtet werden. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass beide verwendeten Primerpaare spezifisch für das humane *CEP290* waren und unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine weiteren Bindestellen im Genom der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie besaßen. Dahingegen konnte in der als Referenz für die Sequenzierung fungierenden *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{WT}-Zelllinie ein PCR-Produkt bei etwas über 300 kDa ausgemacht werden, welches der erwarteten Produktgröße von 318 bp entsprach. Für den Klon 4 der *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{W7C}-Zelllinie konnte mit dem im 5'-Bereich bindenden Primerpaar ebenfalls ein etwa 320 kDa großes Produkt aus der genomischen DNA amplifiziert werden. Folglich konnten sowohl die bereits im Western Blot als positiv verifizierten Zelllinien *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{WT} als auch *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{W7C} an dieser Stelle nochmals validiert werden, wenngleich eine finale Verifizierung auf Sequenzebene erst mit der Sequenzierung möglich war. Darüber hinaus zeigte sich in Klon 1 der *Cep290*^{-/+LAP-CEP290}^{L1141FfsX5}-Zelllinie keinerlei Produkt, in Klon 4 jedoch ein etwa 360 bp großes Fragment, was genau der erwarteten Produktlänge des zweiten, die L1141FfsX5 Mutation im *hCEP290*-Gen flankierenden Primerpaares, von 357 bp entsprach. Dadurch konnte Klon 4 schon an dieser Stelle hinsichtlich einer erfolgreichen Integration der LAP-getaggten *CEP290*^{L1141FfsX5}-Variante validiert werden, auch wenn dies, wie bereits erläutert, nur durch eine Sequenzierung final verifiziert werden konnte. Demgegenüber konnte Klon 1 dieser Zelllinie als falsch-positiv identifiziert werden und wurde daher von der nachfolgenden Charakterisierung ausgenommen.

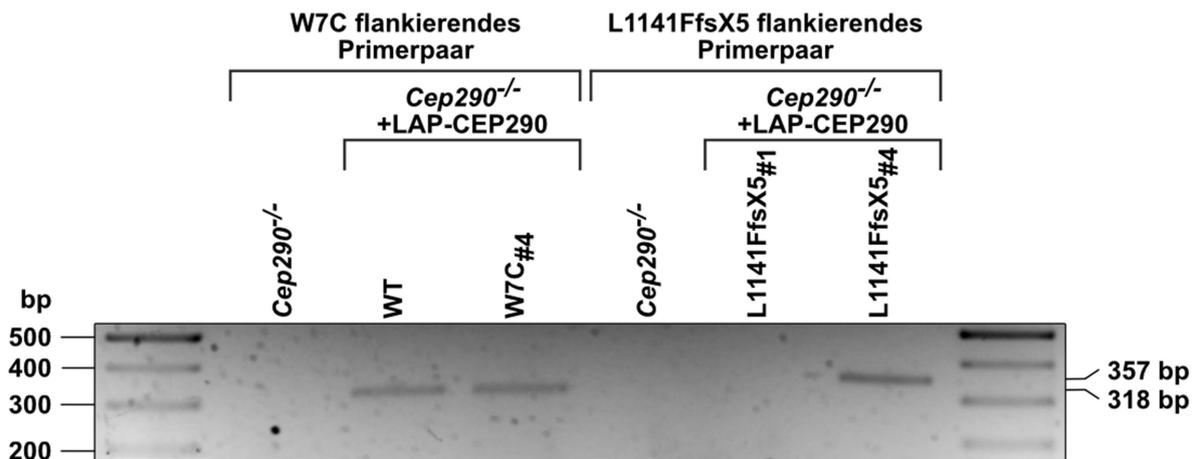


Abbildung 14: Gelelektrophorese der PCR-basierten Amplifikation spezifischer genomischer DNA-Abschnitte in *hCEP290* zur Verifizierung unspezifischer Klone der erzeugten CEP290-Zelllinien. Erkennbar sind die Banden der PCR-Produkte der Zelllinien $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}$ und $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}$ Klon 4 mit einer Länge von jeweils 318 bp, welche durch das erste, die W7C Mutation flankierende Primerpaar generiert wurden. Zudem ist eine Bande mit einer Länge von 357 bp in der Zelllinie $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}$ Klon 4 sichtbar, welche durch das zweite, die L1141FfsX5 Mutation flankierende Primerpaar amplifiziert wurde. In der Zelllinie $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}$ Klon 1 ist dahingegen keine Produktbande zu sehen. In der als Negativkontrolle dienenden $Cep290^{-/-}$ -Zelllinie konnte weder mit dem ersten noch mit dem zweiten Primerpaar ein Produkt generiert werden. Es wurde ein 1,5% Agarosegel verwendet und als Marker „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ (Thermo Scientific) aufgetragen.

Zur anschließenden Sequenzierung wurden die aus der genomischen DNA der $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}$ -, $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}\#4$ - und $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}\#4$ -Zelllinie generierten PCR-Produkte mittels eines Kits aufgereinigt und quantifiziert. Als Primer für die Sequenzierung wurden hier für die Zelllinien $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}$ und $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}\#4$ der zur Amplifikation verwendete im 5'-Bereich bindende *forward* Primer bzw. für $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}\#4$ der 147 bp vor der L1141FfsX5 Mutation gelegene *forward* Primer eingesetzt. Das Ergebnis der Sequenzierungen ist in Abbildung 15 in Form von Chromatogrammen mit den jeweilig resultierenden Aminosäure-Sequenzen veranschaulicht. Wie erwartet, konnte zunächst die wildtypische Sequenz des humanen *CEP290* in der $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}$ -Zelllinie im 5'-Bereich identifiziert werden. Die getestete $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}\#4$ -Zelllinie wies die *missense*-Mutation c.21G>T in *CEP290* resultierend in p.W7C auf, wodurch darauf geschlossen werden konnte, dass beide bereits im Western Blot verifizierten Klone dieser Zelllinie tatsächlich die korrekte Punktmutation enthielten. Daneben konnte erfolgreich die *frameshift*-Mutation c.3422dup in *CEP290* resultierend in p.L1141FfsX5 in der $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}\#4$ -Zelllinie nachgewiesen werden, die auf Nukleotidebene durch die Duplikation eines Thymins hervorgerufen wurde. Somit konnten mit Hilfe dieses Sequenzierungsansatzes die noch unspezifischen CEP290-Zelllinien sicher validiert bzw. im

Fälle von *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#1 falsifiziert werden, was nun eine nachfolgende Charakterisierung aller in dieser Arbeit selektierten *CEP290*-Mutationen erlaubte.

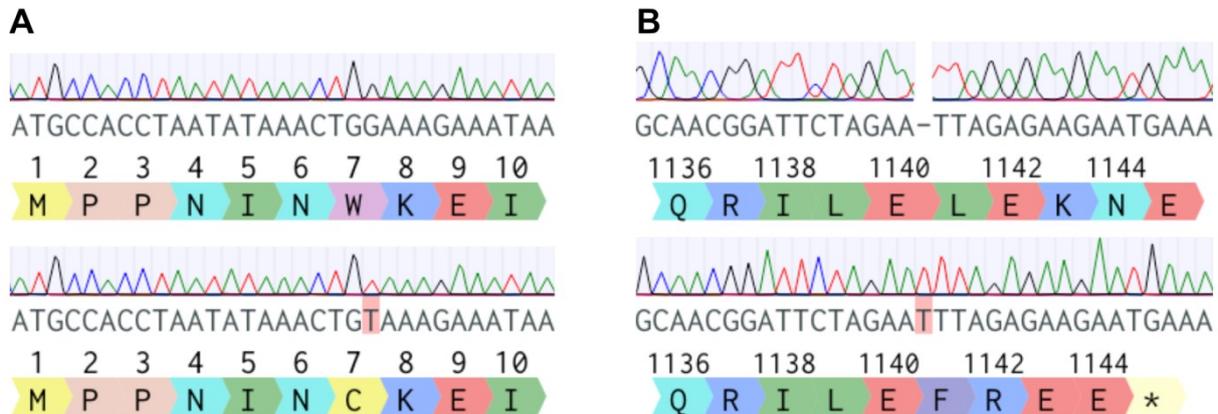


Abbildung 15: Chromatogramme der Sequenzierungen der aus der genomischen DNA der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}#4- und *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie generierten PCR-Produkte mit Darstellung der für die Validierung relevanten Regionen und den resultierenden Aminosäuresequenzen. Die Chromatogramme wurden mit der Software „Benchling“ editiert. A: Das obere Chromatogramm zeigt das 5'-Ende von *CEP290* in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie mit Darstellung der wildtypischen Basen- und AS-Sequenz. Das untere Chromatogramm zeigt die gleiche Region von *CEP290* in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}#4-Zelllinie, welches die Punktmutation c.21G>T (rot hervorgehoben) resultierend in p.W7C aufweist. B: Das obere Chromatogramm zeigt die mittig in *CEP290* gelegene Region mit Darstellung der wildtypischen Basen- und AS-Sequenz. Das untere Chromatogramm zeigt den gleichen Bereich von *CEP290* in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie mit der *frameshift*-Mutation c.3422dup (rot hervorgehoben) resultierend in p.L1141FfsX5.

4.1.3.5. Bestimmung der mRNA-Expressionslevel der CEP290-Varianten mittels qPCR

Da bei der Quantifizierung der CEP290-Level in den unterschiedlichen CEP290-Zelllinien teilweise deutliche Unterschiede ausgemacht wurden, sollte ein qPCR (quantitative Echtzeit-PCR)-basierter Ansatz Erkenntnisse darüber liefern, ob diese eher auf divergente Stabilitäten der Proteinvarianten oder ungleiche Expressionsraten zurückzuführen waren. Allerdings wären unterschiedliche Expressionsraten dabei unerwartet gewesen, denn durch die Integration der *CEP290*-Varianten in den *Fpln*-Locus der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie, stehen alle unter der Regulation des gleichen Promoters (EF-1 α). Der erste Schritt des qPCR-basierten Ansatzes umfasste dabei die RNA-Isolation aus der *Cep290*^{-/-}-, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}- und allen Klonen der mutierten CEP290-Zelllinien (W7C 4+5, E1902X 7+10, Q1942X 2+5, L1141FfsX5 4+5 (Klon 5 war ein weiterer, noch nicht validierter Klon)). Anschließend erfolgte mittels reverser Transkriptase die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA.

Der zweite Schritt bestand in der Auswahl spezifischer Primer für die qPCR, wobei das im LAP-tag enthaltene *EGFP* hierbei zur spezifischen Amplifikation der *CEP290*-Varianten gewählt wurde. Zwei publizierte, bereits in einer qPCR verwendete Primerpaare für *EGFP* [14,55], wurden daraufhin synthetisiert. Als Haushaltsgen für die qPCR-Analyse sollten murines *HPRT1* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) oder *TBP* (TATA-Box-bindendes Protein) amplifiziert werden, welche vorab in der IMCD3-Zelllinie getestet werden sollten. Primer für *HPRT1* und *TBP* wurden dabei freundlicherweise von der AG Niemeyer (Homburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Vor der eigentlichen qPCR erfolgte daher zunächst eine standardmäßige PCR zur Testung aller ausgewählten Primerpaare mit der gewonnenen cDNA aus der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie und der exemplarisch ausgewählten *Cep290*^{-/-}+LAP-*CEP290*^{W7C}#4-Zelllinie. Dabei konnte eine spezifische Amplifikation der beiden Haushaltsgene *TBP* und *HPRT1* in beiden Zelllinien detektiert werden, mit minimal stärkeren Produktbanden bei *TBP*. Im Vergleich dazu ließ sich mit dem *EGFP*-Primerpaar von Chan *et al.* (2011) weder in der als Negativkontrolle dienenden *Cep290*^{-/-}- noch in der *Cep290*^{-/-}+LAP-*CEP290*^{W7C}#4-Zelllinie ein Produkt amplifizieren. Das *EGFP*-Primerpaar von Mayanagi *et al.* (2008) zeigte in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie keine Bildung eines PCR-Produktes und in der *Cep290*^{-/-}+LAP-*CEP290*^{W7C}#4-Zelllinie eine spezifische, wenn auch schwache Produktbande (Daten nicht gezeigt).

Die qPCR wurde dann mit dem *EGFP*-Primerpaar von Mayanagi *et al.* (2008) durchgeführt und als Referenz das Haushaltsgen *TBP* amplifiziert. Als Resultat zeigte sich eine spezifische Schmelzkurve für das mit dem *TBP*-Primerpaar erzeugte PCR-Produkt, welches ab einem Reaktionszyklus von 20 in allen untersuchten Zelllinien exponentiell anstieg. Bei dem verwendeten *EGFP*-Primerpaar entstanden in den allermeisten Zelllinien dahingegen erst Produkte ab dem 25. Reaktionszyklus und die Schmelzkurven dieser verliefen äußerst heterogen, was auf die Bildung unspezifischer Produkte, insbesondere Primer-Dimeren, hindeutete (Daten nicht gezeigt). Der qPCR-basierte Ansatz sollte potentiell unterschiedliche mRNA-Expressionslevel der *CEP290*-Varianten untersuchen, abschließend konnte jedoch keine Aussage getroffen werden, da *EGFP* mit den zwei publizierten Oligonukleotid-Paaren [14,55] nicht amplifiziert werden konnte.

4.2. Charakterisierung der generierten CEP290-Zelllinien

Der zweite Teil der Arbeit bestand in der umfassenden Charakterisierung der generierten und validierten CEP290-Zelllinien. So sollte zum einen die Funktion der Transitions-Zone wie auch insbesondere seines Schlüsselspielers CEP290 näher beleuchtet und zum anderen die pathogenen Mechanismen bei der Erkrankungsgruppe der Ziliopathien detaillierter aufgeklärt werden. Auf molekularer Ebene sollte hierbei in erster Linie untersucht werden, ob CEP290-assoziierte Ziliopathien mit einer gestörten ziliären Barriere bzw. einem aberrantem ziliären Proteintransport als auch mit Veränderungen in der Ziliogenese einhergehen.

Die nachfolgende Charakterisierung sollte dabei als ersten wichtigen Parameter die Wachstumsraten der CEP290-Zelllinien bestimmen. Dadurch sollte der Effekt der jeweiligen Mutation in *CEP290* auf die Wachstumsrate ermitteln werden, um indirekt einen Hinweis auf den Schweregrad der ziliären Dysfunktion zu erhalten. Als zweites sollte die intrazelluläre Lokalisation der CEP290-Varianten mittels Immunfluoreszenz untersucht werden, um potentielle Fehllokalisationen aufzudecken und zusätzlich eine weitere Validierung der Zelllinien zu ermöglichen. Darüber hinaus bestand ein weiterer Aspekt in der Quantifizierung ziliärer Level ausgewählter Kandidatenproteine in den CEP290-Zelllinien und *Pcm-1^{-/-}*-IMCD3, einer *knockout*-Zelllinie eines zentralen Interaktionspartners von CEP290. Hierdurch sollten die molekularen Effekte der Mutationen auf die ziliäre Barriere bzw. den Proteintransport in das Zilium im Vergleich zur Wildtyp-, *Cep290^{-/-}*- und *Pcm-1^{-/-}*-Zelllinie untersucht werden. Ferner sollte im Rahmen dessen auch die Zilienlänge bestimmt werden, um Einflüsse auf die Ziliogenese festzustellen.

4.2.1. Bestimmung der Wachstumsraten der erzeugten CEP290-Zelllinien

Alle generierten CEP290-Zelllinien sollten zunächst hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens mit den WT- und *Cep290^{-/-}*-IMCD3-Zelllinien verglichen werden. Die Wachstums-Analyse basierte auf einer Färbung der Zellen mit Kristallviolett, welche nach unterschiedlichen Wachstumszeiten durchgeführt wurde. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 16 nicht alle generierten CEP290-Zelllinien im Vergleich zur WT- und *Cep290^{-/-}*-IMCD3-Zelllinie in einem Graphen dargestellt, sondern unterteilt in den Abschnitten A-D. Eine Gesamtabbildung mit allen erzeugten CEP290-Zelllinien befindet sich im Anhang (Abbildung 26).

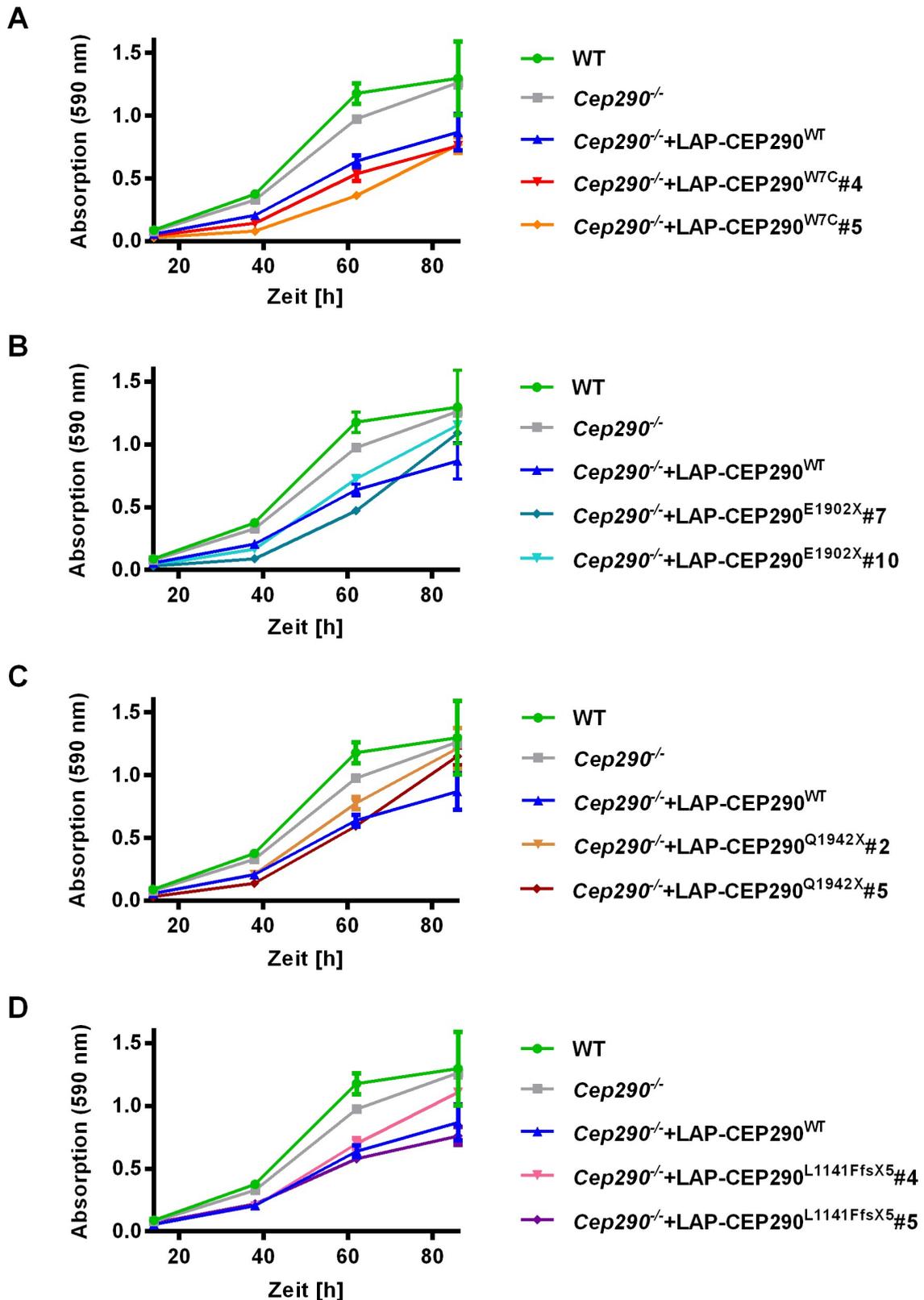


Abbildung 16: Wachstumskurven der generierten CEP290-Zelllinien im Vergleich zur WT- und *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie (A-D). Die Messung nach Kristallviolett-färbung der Zellen und Reextraktion des Farbstoffes erfolgte nach 14, 38, 62 und 86 Stunden Inkubation jeweils im technischen Triplikat bei einer Absorption von 590 nm. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Insgesamt betrachtet zeigten alle erzeugten CEP290-Zelllinien im Vergleich zur WT- und auch zur *Cep290*^{-/-}-Zelllinie deutlich verlangsamte Wachstumsraten (Abbildung 16). Dabei unterschieden sich die Wachstumsraten der WT- und *Cep290*^{-/-}-Zelllinie geringfügig voneinander, so wies die wildtypische Zelllinie eine etwas schnellere Proliferationsrate auf. Die beiden untersuchten Klone jeder erzeugten Zelllinie wiesen hierbei ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten auf, was auf eine hohe Konsistenz des Messverfahrens schließen ließ. Hiervon ausgenommen war die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie, welche aus einem Pool von Klonen bestand. Dabei ergaben sich allerdings Unterschiede zwischen den verschiedenen CEP290-Zelllinien, wobei diese nun detaillierter anhand der einzelnen Abschnitte A-D in Abbildung 16 beschrieben werden sollen. Als eine geeignete Referenz hierfür stellte sich die in allen Diagrammen inkludierte Wachstumskurve der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie heraus. Die CEP290-Zelllinien mit der Mutation W7C zeigten hierbei das langsamste Wachstumsverhalten aller generierten Zelllinien und wiesen auch nach 86 Stunden Inkubation noch eine niedrigere Konfluenz als die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie auf (Abschnitt A). Die Zelllinien mit der Mutation E1902X wiesen demgegenüber ein größtenteils deckungsgleiches Wachstumsverhalten verglichen mit der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie auf (Abschnitt B). Allerdings zeigten die Zelllinien mit der Mutation E1902X nach 62 Stunden Inkubation noch einen Anstieg in der Proliferationsrate, weshalb die Konfluenz nach 86 Stunden höher lag. In nahezu identischer Weise präsentierten sich auch die Wachstumsraten der CEP290-Zelllinien mit der in der selben Region liegenden Mutation Q1942X (Abschnitt C). Die CEP290-Zelllinien mit der Mutation L1141FfsX5 zeigten ein zur *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie vergleichbares Wachstumsverhalten, möglicherweise mit minimal höherer Konfluenz zum Ende der Messung (Abschnitt D). Wie bereits erwähnt, wurde der hier mit in die Analyse einbezogene Klon 5 im Rahmen dieser Arbeit noch nicht mittels Sequenzierung validiert. Da dieser allerdings ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten wie der validierte Klon 4 zeigte, zumindest bis zum Messzeitpunkt von 62 Stunden, konnte angenommen werden, dass Klon 5 höchstwahrscheinlich auch positiv hinsichtlich einer Integration von *LAP-CEP290*^{L1141FfsX5} war. Abschließend konnte die Wachstums-Analyse somit deutliche Defizite in der Proliferationsrate aller generierten CEP290-Zelllinien aufdecken.

4.2.2. Immunfluoreszenz-basierte Bestimmung der Lokalisation der CEP290-Varianten innerhalb der Zelle und zusätzliche Verifizierung der erzeugten CEP290-Klone

Der folgende Teil der Charakterisierung umfasste die Bestimmung der Lokalisation der CEP290-Varianten innerhalb der Zelle mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-basierten Untersuchung. Daneben sollten die erzeugten CEP290-Zelllinien zusätzlich hinsichtlich einer erfolgreichen Integration der an einen LAP-tag fusionierten CEP290-Varianten validiert werden. Bei dieser Analyse wurden allerdings nicht alle generierten Klone untersucht, sondern eine Auswahl auf Basis der Proteinlevel der CEP290-Varianten unter Zugabe eines Proteasom-Inhibitors (siehe Abbildung 13), welcher einen möglichen Abbau der CEP290-Varianten verhindern sollte, getroffen. Hierbei wurden jeweils die Klone ausgesucht, die möglichst ähnliche Expressionslevel von CEP290 verglichen mit der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie aufwiesen. Dementsprechend die Zelllinien *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}#4, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}#10 und *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2. Für *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4 erfolgte die Selektion aufgrund der erfolgreichen Validierung mittels Sequenzierung, da diese CEP290-Variante nicht im Western Blot detektiert werden konnte.

Als bildgebendes Verfahren wurde hierbei die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Arl13b (*ADP-Ribosylation factor-like protein 13b*) wurde mittels spezifischer Antikörper visualisiert und diente somit als ziliärer Marker, was essentiell zur genauen Beurteilung der Lokalisation von Signalen innerhalb des Ziliums war. Der an die CEP290-Varianten fusionierte LAP-tag ermöglichte durch GFP-Fluoreszenz das Fusionsprotein intrazellulär zu lokalisieren. Als Negativkontrolle diente bei der Untersuchung die *Cep290*^{-/-}-Zelllinie, welche kein GFP exprimiert. Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Zelllinien *Cep290*^{-/-}, *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT} und den selektierten Klonen mit den mutierten CEP290-Varianten sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellt. Dabei zeigte sich in den Aufnahmen aller Zelllinien, einschließlich der *Cep290*^{-/-}-Negativkontrolle, ein Arl13b-Signal über die ganze Ziliumlänge. Dahingegen konnte in den beiden exemplarisch gezeigten Aufnahmen der *Cep290*^{-/-}-Negativkontrolle im GFP-Kanal kein distinktes Signal in der Zelle detektiert werden, sondern nur ein diffuses, schwaches Signal innerhalb des Ziliums (siehe Abbildung 17, obere Aufnahmen). Allerdings zeigte sich im GFP-Kanal generell eine moderate, diffuse Hintergrundfärbung über die ganze Zelle, die anschaulich in der Überlagerung beider Kanäle, GFP und Arl13b, deutlich wurde (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). In der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie zeigten sich demgegenüber gleich mehrere, distinkte GFP-Signale an der putativen Basis des Ziliums (siehe Abbildung 17, mittlere Aufnahmen). Diese waren potentiell in der Transitions-Zone, der Mutter- bzw. Tochterzentriole oder auch

in den zentriolären Satelliten lokalisiert, was an dieser Stelle aber nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. In den überlagerten Aufnahmen des Arl13b- und GFP-Kanals der *Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}*-Zelllinie wurde jedoch deutlich, dass einer der GFP-Signale wahrscheinlich am proximalen Ende des Ziliums mit Arl13b kolokalisierte (siehe Abbildung 17, mittlere Aufnahmen). Somit lag dieses GFP-Signal noch innerhalb des Ziliums, vermutlich in der Transitions-Zone. Anhand der GFP-Signale konnte die aus einem Pool von Klonen bestehende *Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}*-Zelllinie folglich neben dem Western Blot auch mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nochmals validiert werden. Die *Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}*-Zelllinie zeigte in der Immunfluoreszenz ein ähnliches Bild wie die *Cep290^{WT}#4*-Zelllinie, da wiederum mindestens zwei differenzierbare GFP-Signale an der Basis detektiert werden konnten (siehe Abbildung 17, untere Aufnahmen). Auch hier stellte sich am putativ proximalen Ende des Ziliums eine Kolokalisation mindestens eines GFP-Signals mit dem Signal von Arl13b dar, wobei in der unteren der beiden Aufnahmen ein zusätzlicher GFP-Signalkpunkt distal innerhalb des Ziliums lag. Letzterer konnte somit entweder noch in der Transitions-Zone oder aber fehllokalisiert im Schaft lokalisiert gewesen sein. Durch dieses Ergebnis konnte die Zelllinie eindeutig bezüglich einer erfolgreichen Expression der an einen LAP-tag fusionierten CEP290-Variante verifiziert werden, übereinstimmend mit dem Resultat des Western Blots.

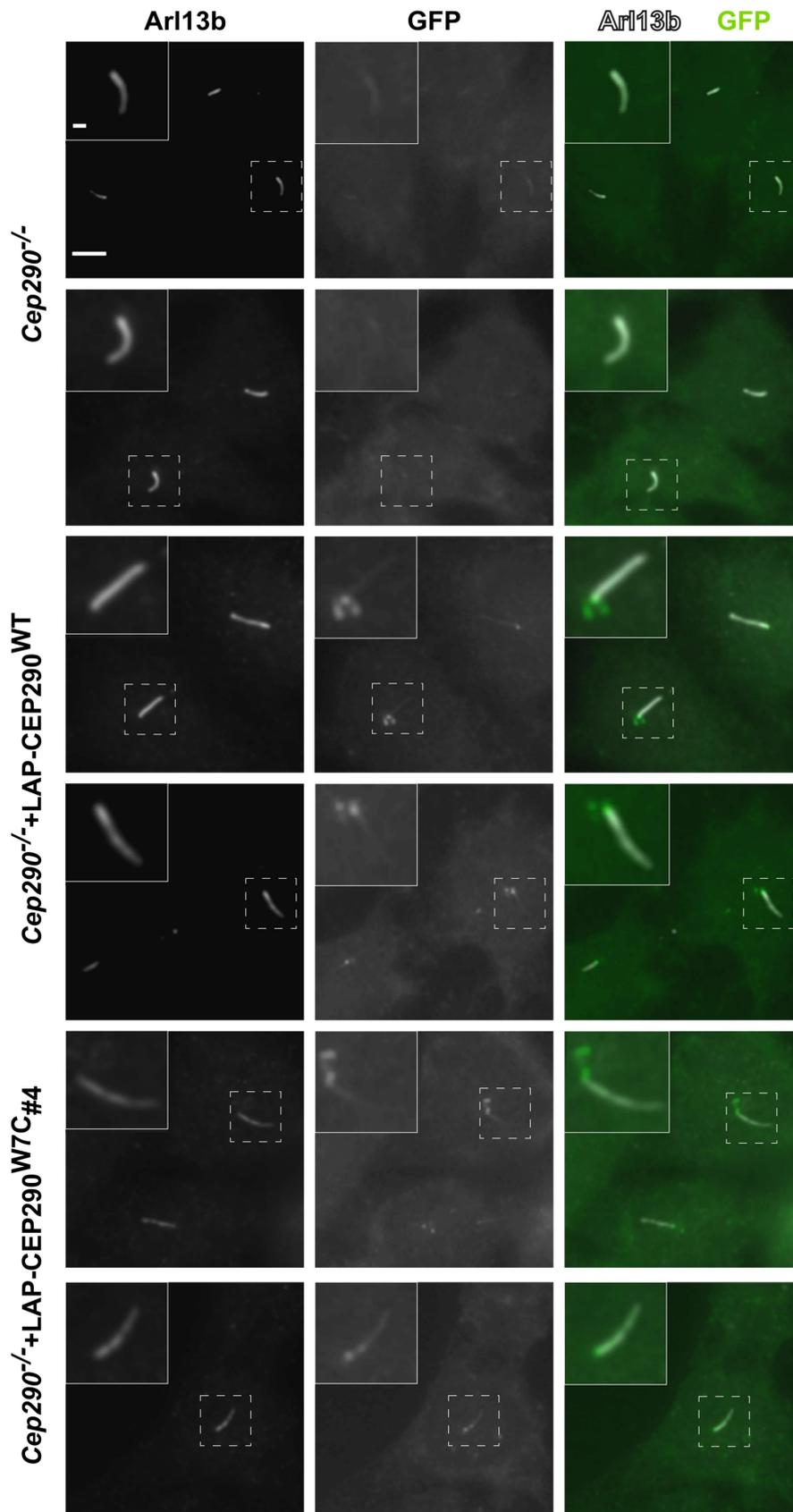


Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopie der IMCD3-Zelllinien $Cep290^{-/-}$, $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}$ und $Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C\#4}$. Die erste Spalte von links zeigt den Kanal des Zilienmarkers Arl13b (*ADP-Ribosylation factor-like protein 13b*). Die an einen LAP-tag fusionierte CEP290-Variante konnte direkt durch die GFP (Grün fluoreszierendes Protein)-Fluoreszenz,

dargestellt in Spalte 2, detektiert werden. Die beiden Kanäle sind überlagert in Spalte 3 gezeigt, wobei die Signale von Arl13b in weiß und von GFP in grün angezeigt sind. Der Maßstab beträgt 5 μm (Hauptbild) und 1 μm (Zoom).

Ausgewählte Immunfluoreszenzbilder der ausstehenden CEP290-Zelllinien sind in Abbildung 18 zusammengestellt. Die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}#10-Zelllinie zeigte hierbei im GFP-Kanal ebenfalls distinkte Signale an der potentiellen Basis des Ziliums, wenngleich diese auch eher schwach ausfielen (siehe Abbildung 18, obere Aufnahmen). Insbesondere in der unteren der beiden Aufnahmen sichtbar, wurde auch hier ein mit Arl13b kolokalisierendes Signal am putativ proximalen Ende des Ziliums deutlich. Weitere GFP-Signale konnten möglicherweise in der Region der Mutter- bzw. Tochterzentriole verortet werden. Eine Validierung der Zelllinie konnte folglich auch hier mittels der Immunfluoreszenz-basierten Analyse durchgeführt werden. Bei der Untersuchung der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie zeigte sich in beiden dargestellten Aufnahmen ein mäßig starkes, aber distinktes GFP-Signal an der putativen Basis des Ziliums (siehe Abbildung 18, mittlere Aufnahmen). Das Signal lag hierbei noch im Zilium, da es gerade noch mit dem Ziliummarker überlappte und war somit höchstwahrscheinlich in der Transitions-Zone lokalisiert. Daher konnte an dieser Stelle auch die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie nochmals verifiziert werden, übereinstimmend mit dem Western Blot, wobei dort ohne die Zugabe eines Proteasom-Inhibitors nur ein sehr geringes Proteinlevel dieser CEP290-Variante detektiert werden konnte. In den Immunfluoreszenz-Aufnahmen der zuletzt untersuchten *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie konnte, im Gegensatz zu allen anderen erzeugten Zelllinien, kein klares GFP-Signal im oder in der Nähe des Ziliums nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18, untere Aufnahmen). Es zeigte sich lediglich ein sehr schwaches, diffuses Signal im GFP-Kanal innerhalb des durch Arl13b gekennzeichneten Ziliums, vergleichbar mit dem ziliären GFP-Signal in der als Negativkontrolle dienenden *Cep290*^{-/-}-Zelllinie. Diese Beobachtung war damit ebenfalls konsistent mit den Ergebnissen aus den sowohl mit als auch ohne Zugabe eines Proteasom-Inhibitors durchgeführten Western Blots der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie. Denn dort konnte auch keine Expression des CEP290-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Demzufolge ließ sich diese CEP290-Zelllinie nicht mit Hilfe der hier durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie validieren, wobei die Integration des *LAP-CEP290*^{L1141FfsX5}-Konstruktes in das Genom der Zelllinie bereits durch die Sequenzierung sicher validiert werden konnte.

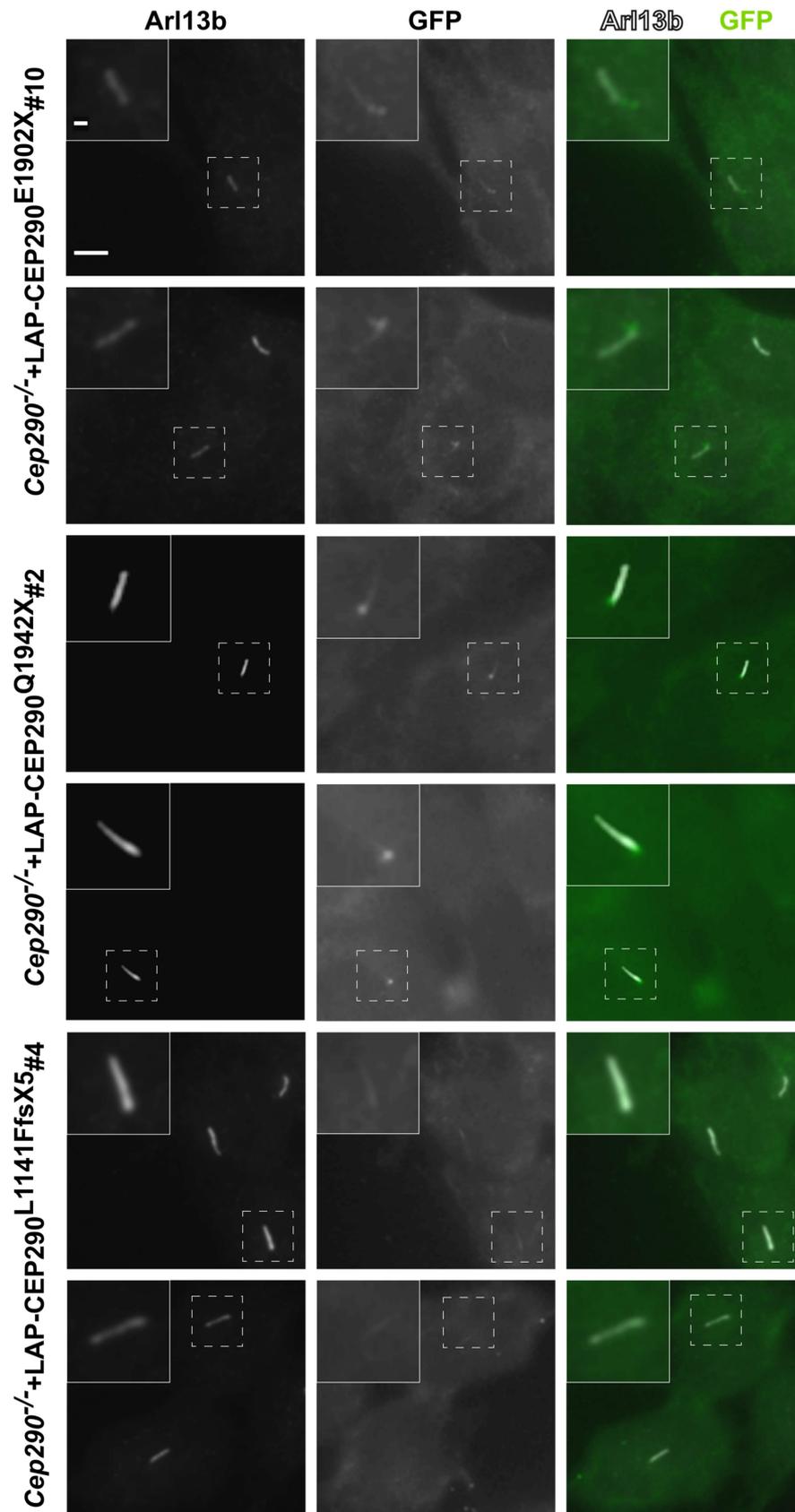


Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopie der IMCD3-Zelllinien $Cep290^{-/-}$ +LAP-CEP290^{E1902X}#10, $Cep290^{-/-}$ +LAP-CEP290^{Q1942X}#2 und $Cep290^{-/-}$ +LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4. Die erste Spalte von links zeigt den Kanal des Zilienmarkers Arl13b (*ADP-Ribosylation factor-like protein 13b*). Die an einen LAP-tag fusionierte CEP290-Variante konnte direkt durch die GFP (Grün

fluoreszierendes Protein)-Fluoreszenz, dargestellt in Spalte 2, detektiert werden. Die beiden Kanäle sind überlagert in Spalte 3 gezeigt, wobei die Signale von Arl13b in weiß und von GFP in grün angezeigt sind. Der Maßstab beträgt 5 µm (Hauptbild) und 1 µm (Zoom).

Darüber hinaus wurden bei der Betrachtung aller Aufnahmen in Abbildung 17 und Abbildung 18 unterschiedliche Intensitäten des Zilienmarkers Arl13b zwischen den verschiedenen Zelllinien sichtbar. Besonders markant zeigte sich das beispielsweise beim Vergleich des ziliären Arl13b-Signals in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}#10- mit der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie. Dies deutete darauf hin, dass unterschiedliche Proteinlevel von Arl13b in den Zilien der verschiedenen CEP290-Zelllinien vorlagen, was im folgenden Teil der Arbeit noch genauer untersucht werden sollte.

4.3. Quantifizierung ziliärer Level ausgewählter Kandidatenproteine in der WT-, *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie sowie den generierten CEP290-Zelllinien

Der nächste Teil dieser Arbeit bestand in einer vergleichenden Analyse ausgewählter ziliärer Proteine in der WT-, *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie sowie den generierten CEP290-Zelllinien. Auch hier wurden die Klone der CEP290-Zelllinien analog zur Immunfluoreszenz-basierten Analyse untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden ziliären Proteine wurde auf Grundlage der bereits in der AG Mick durchgeführten Studie zur *Cep290*^{-/-}-Zelllinie getroffen (Mick, unveröffentlicht). Dabei wurde der Fokus auf ziliäre Proteine gelegt, welche in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie reduzierte Proteinlevel im Zilium zeigten, was unter anderem für Fam92a1, Ift88 und Arl13b der Fall war. Das Ziel dieses Teils war es somit zu evaluieren, inwiefern die ausgewählten CEP290-Mutationen die Proteinlevel der im Zilium lokalisierten und in die Signaltransduktion bzw. in die Ziliogenese involvierten Kandidatenproteine verändern. Dadurch sollten wiederum Rückschlüsse auf eine potentiell dysfunktionale ziliäre Barriere gezogen sowie die molekulare Funktion von CEP290 näher beleuchtet werden. Daneben sollte Pcm-1 als bekannter Interaktionspartner von CEP290 in einem anschließenden Teil hinsichtlich seiner intrazellulären Lokalisierung in den genannten Zelllinien analysiert werden. Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Analysen auch eine von der AG Firat-Karalar (Istanbul, Türkei) etablierte *Pcm-1*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie mitgeführt. Hierbei sollten nähere Erkenntnisse über die noch nicht vollständig verstandene Interaktion von CEP290 und PCM-1 gewonnen und gleichzeitig ermittelt werden, wie sich die Level der Kandidatenproteine in der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zu der *Cep290*^{-/-} bzw. den mutierten CEP290-Zelllinien verhalten. Technisch basierte die Quantifizierung der ziliären Proteinlevel dabei auf der Auswertung von Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Zelllinien. Die Ergebnisse

der ermittelten Abundanzen der ausgewählten Proteine sollen im Folgenden näher erörtert werden.

4.3.1.1. Fam92a1

Als erstes wurden die ziliären Proteinlevel des BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs)-Domänen-Proteins Fam92a1 (*Family With Sequence Similarity 92 Member A1*) in allen genannten Zelllinien analysiert [52]. Abbildung 19 stellt die in den Zilien gemessenen, relativen Fluoreszenzintensitäten des Kandidatenproteins Fam92a1 dar. Hierbei offenbarte sich, dass Fam92a1 in den meisten untersuchten Zelllinien im Vergleich zur WT-Zelllinie keine signifikanten Veränderungen bezüglich seiner ziliären Abundanz aufwies. Einzig in der *Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4*-Zelllinie konnten signifikant erhöhte Proteinlevel von Fam92a1 festgestellt werden. Jedoch war hier auch eine hohe Varianz der Messwerte festzustellen. Folglich zeigte sich Fam92a1 hinsichtlich seiner Abundanz weitgehend unverändert in den beiden *knockout*- und den generierten CEP290-Zelllinien. Damit offenbarte sich hier eine Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorangegangenen Studie zur *Cep290^{-/-}*-Zelllinie, bei welcher in der massenspektrometrischen Analyse des ziliären Proteoms eine Reduktion von Fam92a1 gegenüber der wildtypischen Zelllinie vermutet wurde (Mick, unveröffentlicht).

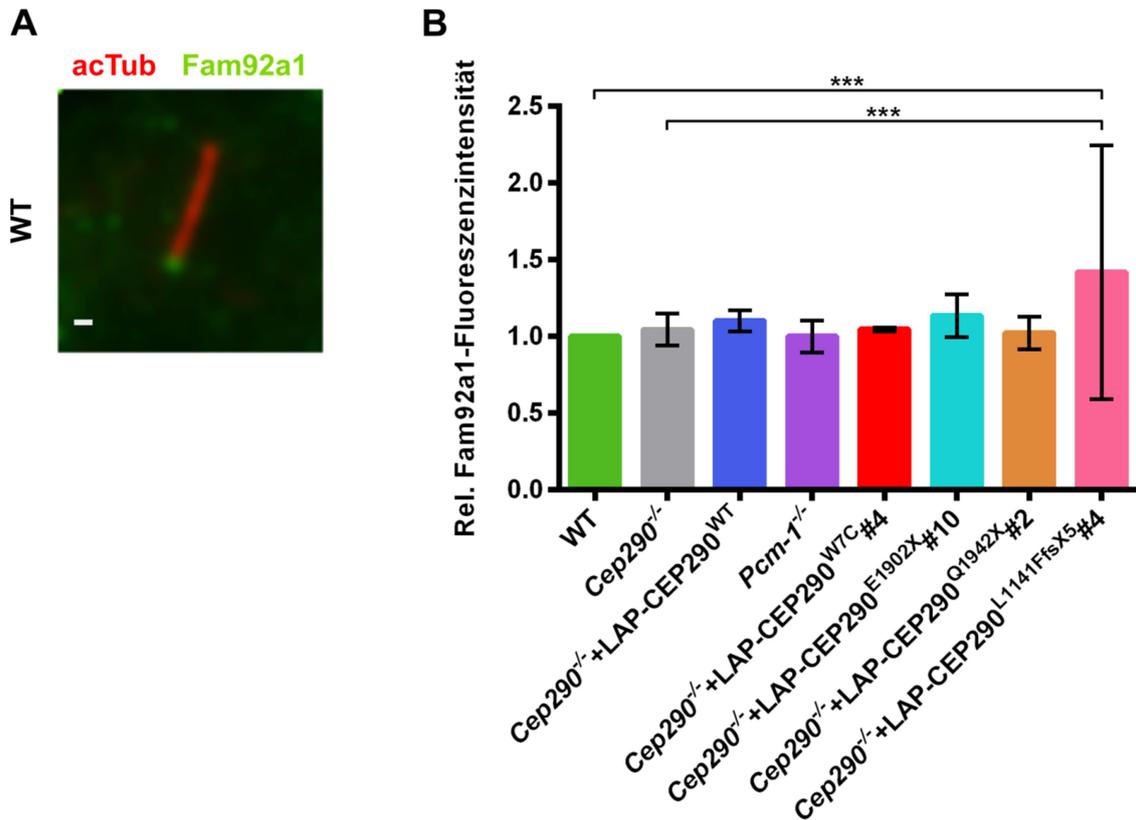


Abbildung 19: A: Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem Kandidatenprotein Fam92a1 in grün. Der Maßstab beträgt 1 μ m. **B:** Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten von Fam92a1 in den Zilien der untersuchten Zelllinien. Die Standardabweichungen der gemittelten Werte sind jeweils angezeigt. $n \geq 2$ mit Quantifizierung von jeweils 30 Zilien. Statistische Analyse mittels Bonferroni-Test durch Vergleich der Mittelwerte aller Zelllinien miteinander, der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle Signifikanzniveaus angegeben. *** $p \leq 0,001$. Fam92a1, *Family With Sequence Similarity 92 Member A1*.

4.3.1.2. Ift88

4.3.1.2.1. Immunfluoreszenz-basierte Quantifizierung

Das zweite Kandidatenprotein Ift88 ist eine zentrale Komponente des intraflagellären Transportes (IFT) [74]. Die Quantifizierung der ziliären Proteinlevel ist hierbei in Abbildung 20 gezeigt, wobei diese wiederum anhand der relativen Fluoreszenzintensitäten von Ift88 bestimmt wurden. Beim Vergleich der ziliären Abundanz von Ift88 in den unterschiedlichen Zelllinien zeigten sich ähnliche Niveaus zwischen den Zelllinien WT und Cep290^{-/-}, Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}, Pcm-1^{-/-}, Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}#4 sowie Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}#10. Dahingegen konnte eine nahezu dreifache Anreicherung von Ift88 in der Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie festgestellt werden, die sich gegenüber allen anderen Zelllinien als signifikant erwies. Trotz dessen zeigte sich auch hier eine große Streuung der Messwerte um den Mittelwert. Des Weiteren konnte in der Cep290^{-/-}+LAP-

CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie ein signifikant erhöhtes Proteinlevel von Ift88 zumindest gegenüber der *Cep290*^{-/-}, *Pcm-1*^{-/-}, *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{W7C}#4- sowie *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{E1902X}#10-Zelllinie festgestellt werden. Absolut betrachtet war die Erhöhung des Proteinlevels hier jedoch geringer als in der *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie. Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorangegangenen Studie, bei welcher in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie eine Reduktion von Ift88 um circa 30% gegenüber der WT-Zelllinie ermittelt wurde (Mick, unveröffentlicht), konnte diese Änderung bei diesem Immunfluoreszenz-basierten Ansatz nicht detektiert werden. Zusammenfassend konnten deutliche Anreicherungen von Ift88 in der *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{Q1942X}#2- und *Cep290*^{-/+}LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie beobachtet werden, die sich gegenüber den meisten anderen untersuchten Zelllinien als signifikant erwiesen.

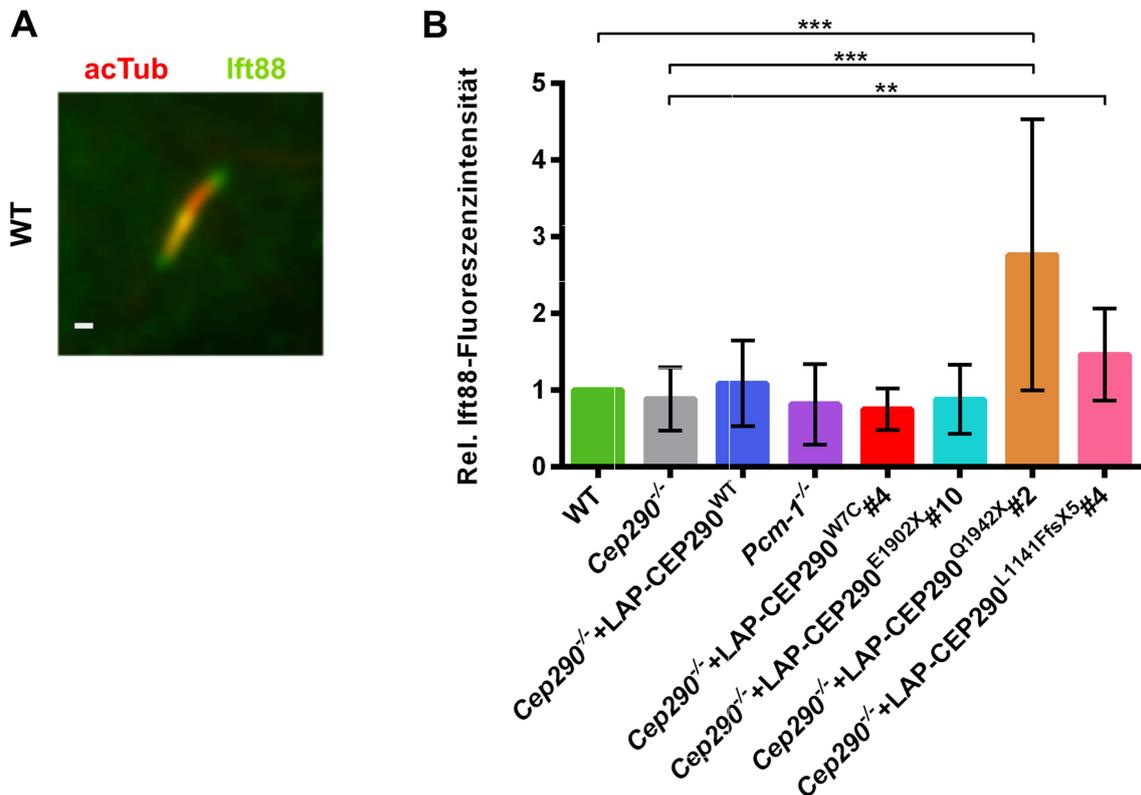


Abbildung 20: A: Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem Kandidatenprotein Ift88 in grün. Der Maßstab beträgt 1 µm. **B:** Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten von Ift88 in den Zilien der untersuchten Zelllinien. Die Standardabweichungen der gemittelten Werte sind jeweils angezeigt. n ≥ 2 mit Quantifizierung von jeweils 30 Zilien. Statistische Analyse mittels Bonferroni-Test durch Vergleich der Mittelwerte aller Zelllinien miteinander, der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle Signifikanzniveaus angegeben. ***p ≤ 0,001, **p ≤ 0,01. Ift88, Intraflagelläres Transportprotein 88 Homolog.

4.3.1.2.2. *Proximity Labelling*-basierte Analyse in der WT-, *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie

Aufgrund der Tatsache, dass sich für die Kandidatenproteine Fam92a1 und Ift88 in den Immunfluoreszenz-basierten Quantifizierungen nicht die vormals ermittelten Veränderungen in der *Cep290*^{-/-}- gegenüber der WT-Zelllinie zeigten, sollte an dieser Stelle noch ein anderer Ansatz zur Analyse der Proteinlevel in Zilien getestet werden. Dieser Ansatz basierte, wie bei der bereits vorliegenden Studie zur *Cep290*^{-/-}-Zelllinie (Mick, unveröffentlicht), auf der Technik des *Proximity Labelling*. Exemplarisch sollte dabei Ift88 näher untersucht werden. Dazu wurden Zelllinien verwendet, welche bereits in der AG Mick etabliert wurden und das APEX-Enzym stabil im Zilium exprimierten („Cilia-APEX“), und somit ein gezieltes *Labelling* der ziliären Proteinkomposition ermöglichten [56]. Zu diesen „Cilia-APEX“-Zelllinien gehörten eine WT-, *Cep290*^{-/-}- und eine *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie. Als Negativkontrolle sollte eine unveränderte WT-Zelllinie dienen.

Demzufolge wurde das *Proximity Labelling* mit den 4 aufgeführten Zelllinien durchgeführt und anschließend die gesamten Proteine extrahiert („Totals“) und die markierten, ziliären Proteine mittels Streptavidin-Chromatographie isoliert („Eluate“). Danach folgte eine SDS-PAGE- und Western Blot-basierte Analyse der „Totals“ und „Eluate“, welche in Abbildung 21 dargestellt ist. Hierbei wurden die Proteinabundanz von GFP, acetyliertem Tubulin, Ift88 und β -Aktin mittels spezifischer Antikörper untersucht. GFP fungierte dabei als Kontrolle der eingesetzten Zelllinien, da hiermit das an das APEX-Enzym fusionierte GFP detektiert werden konnte. Hierbei konnten Banden für GFP erfolgreich in den „Totals“ und „Eluaten“ aller „Cilia-APEX“-Zelllinien bei der erwarteten Größe des Fusionsproteins von 82 kDa erkannt werden, auch wenn die Proteinlevel zwischen den einzelnen Zelllinien variierten. In der als Negativkontrolle dienenden WT-Zelllinie konnten keine Banden ausgemacht werden. Des Weiteren sollte das etwa 42 kDa große β -Aktin als nicht-ziliär lokalisiertes Strukturprotein als Negativkontrolle für die „Eluate“ dienen. So konnte es in allen Zelllinien in den „Totals“ als starke Bande bei der entsprechenden Größe detektiert werden. Dahingegen war es in allen „Cilia-APEX“-Zelllinien nur noch in sehr geringen Mengen in den „Eluaten“ erkennbar. Im Vergleich dazu war in der WT-Zelllinie eine ähnlich schwache Bande für β -Aktin im „Eluat“ sichtbar, weshalb es sich hier und in den „Eluaten“ der „Cilia-APEX“-Zelllinien um Hintergrund der Isolation handelte. Acetyliertes Tubulin hingegen wird auch als ziliärer Marker eingesetzt und konnte daher in allen „Cilia-APEX“-Zelllinien sowohl in den „Totals“ als auch in den „Eluaten“ bei der erwarteten Größe von etwa 50 kDa detektiert werden. Dabei stellte sich die Aufreinigung augenscheinlich als höchst effizient heraus, da eine deutlich stärkere Bande in den „Eluaten“ erkannt wurde. Allerdings zeigte sich neben einer distinkten Bande in der „Total“-Probe eine ähnliche starke Bande widersprüchlicher

Weise auch im „Eluat“ der WT-Zelllinie, weshalb die Effizienz der Aufreinigung abschließend nicht sicher beurteilt werden konnte. Für das Kandidatenprotein Ift88 wurden in den „Totals“ aller Zelllinien etwa gleich starke Banden bei der erwarteten Größe von 94 kDa erkannt. In allen „Eluaten“ der „Cilia-APEX“-Zelllinien wurden ebenfalls Banden erkannt, die sich aber deutlich in ihrer Intensität unterschieden. So war in der wildtypischen „Cilia-APEX“-Zelllinie zwar eine distinkte Bande sichtbar, in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie dahingegen aber eine deutlich stärkere Bande. In der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie zeigte sich im Vergleich dazu lediglich eine sehr schwache Bande. In der Negativkontrolle, der WT-Zelllinie, konnte im „Eluat“ ebenfalls nur eine äußerst schwache Bande detektiert werden. Dies deutete darauf hin, dass Ift88 in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie potentiell angereichert und in der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie depletiert vorlag, was den Ergebnissen aus der vorangegangenen Studie zu der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie (Mick, unveröffentlicht) bzw. den in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-basierten Quantifizierungen widerspricht.

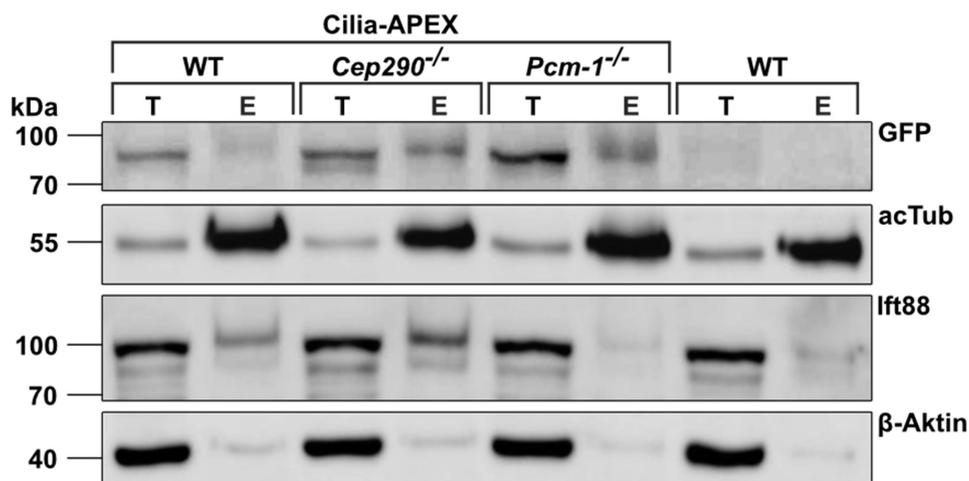


Abbildung 21: Analyse der gesamt extrahierten Proteine („Totals“) und der isolierten, ziliären Proteine („Eluate“) aus den „Cilia-APEX“-Zelllinien mit WT-, *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Hintergrund, sowie einer als Negativkontrolle dienenden, unveränderten WT-Zelllinie mittels SDS-PAGE und Western Blot. Die Auftrennung erfolgte in 10% Trenngelen. Die angezeigten Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. acTub, acetyliertes Tubulin; GFP, Grün fluoreszierendes Protein; Ift88, Intraflagelläres Transportprotein 88 Homolog.

Zusammenfassend lieferte der *Proximity Labelling*-basierte Ansatz als alternative Technik zur Immunfluoreszenz-basierten Quantifizierung der ziliären Ift88-Level zu den vorangegangenen Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Abundanz von Ift88 in der *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie.

4.3.1.3. Arl13b

Neben Ift88 hat auch Arl13b (*ADP-Ribosylation factor-like protein 13b*) einen Einfluss auf den intraflagellären Transport im Zilium [63] und es sollte nun untersucht werden, ob potentielle Veränderungen der ziliären Proteinlevel in den unterschiedlichen *knockout*- und generierten CEP290-Zelllinien nachgewiesen werden konnten. Die Quantifizierung der Arl13b-Level, basierend auf den gemessenen Fluoreszenzintensitäten in den Immunfluoreszenz-Aufnahmen, ist in Abbildung 22 gezeigt. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien, wobei als Referenz bei der folgenden Beschreibung stets die WT-Zelllinie dienen soll. So wies die *Cep290*^{-/-}-Zelllinie deutlich verringerte Arl13b-Level auf, übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der in der AG Mick durchgeführten, unveröffentlichten Studie. Die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie zeigte dahingegen ein vergleichbares Arl13b-Level wie die WT-Zelllinie. In der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie konnte eine ähnlich verringerte ziliäre Abundanz von Arl13b wie in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie beobachtet werden. Die generierten CEP290-Zelllinien, welche Mutationen in *CEP290* enthielten, zeigten allesamt reduzierte Level von Arl13b, die jedoch unterschiedlich stark ausfielen. So wiesen die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}#4- und die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{E1902X}#10-Zelllinie mit einer Verringerung um etwa 50% die geringsten ziliären Abundanzen von Arl13b auf, gefolgt von der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie. Demgegenüber zeigte die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie augenscheinlich die höchsten Arl13b-Level auf, obgleich kein signifikanter Unterschied gegenüber der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie ermittelt werden konnte. Beim Vergleich dieser mutierten CEP290-Zelllinien mit der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede. Abschließend konnte für Arl13b somit die in der vorangegangenen Studie ermittelte Depletion in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie auch in dieser Arbeit verifiziert werden. Eine ähnlich starke Depletion konnte daneben auch in der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie ausgemacht werden. Die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie zeigte dahingegen wildtypische Proteinlevel von Arl13b. Alle mutierten CEP290-Zelllinien wiesen verringerte Abundanzen von Arl13b auf, wobei diese in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2- und der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}#4-Zelllinie etwas weniger stark ausfielen.

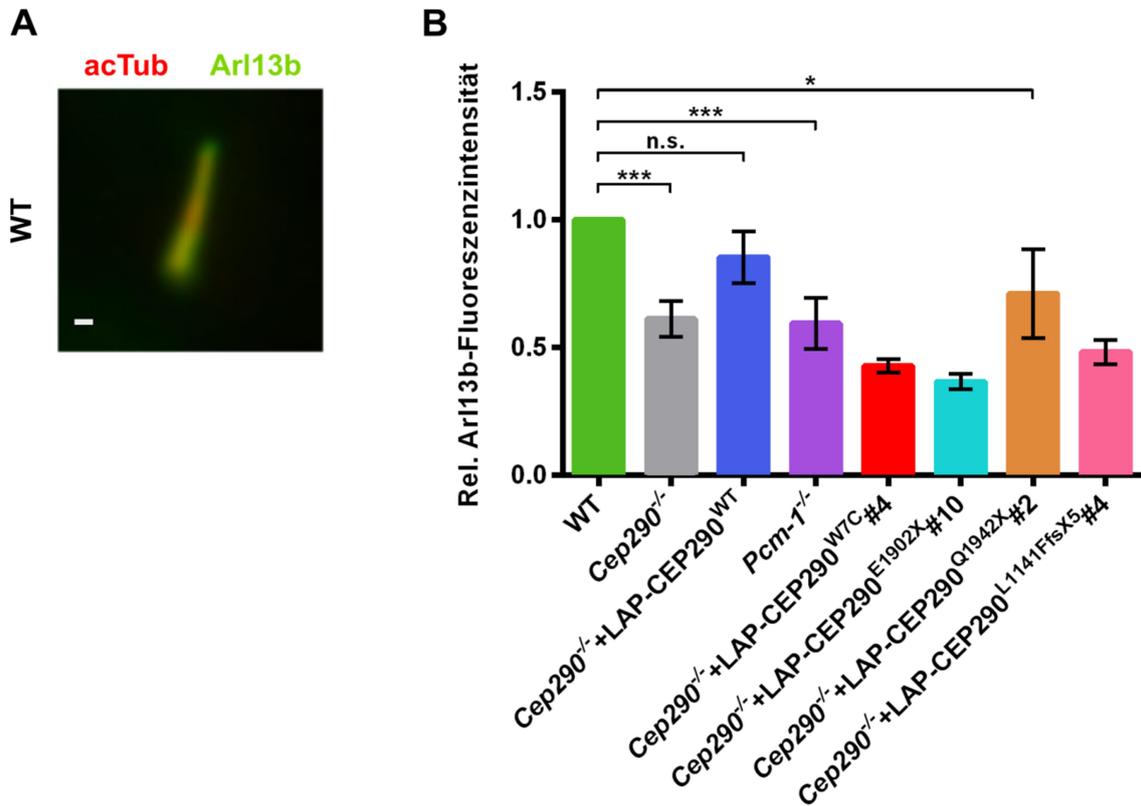


Abbildung 22: **A:** Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem Kandidatenprotein Arl13b in grün. Der Maßstab beträgt 1 µm. **B:** Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten von Arl13b in den Zilien der untersuchten Zelllinien. Die Standardabweichungen der gemittelten Werte sind jeweils angezeigt. n ≥ 2 mit Quantifizierung von jeweils 30 Zilien. Statistische Analyse mittels Bonferroni-Test durch Vergleich der Mittelwerte aller Zelllinien miteinander, der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle Signifikanzniveaus angegeben. ***p ≤ 0,001, *p ≤ 0,05, n.s. = nicht signifikant. Arl13b, ADP-Ribosylation factor-like protein 13b.

4.4. Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung des CEP290-Interaktionspartners Pcm-1 in der WT- und Cep290^{-/-}-Zelllinie sowie den generierten CEP290-Zelllinien

Darüber hinaus sollte der bekannte Interaktionspartner von CEP290, Pcm-1 (Perizentrioläres Material 1) [46], hinsichtlich seiner intrazellulären Lokalisierung an der ziliären Basis in allen Zelllinien, außer der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie, analysiert werden. Denn in einer vorangegangenen Studie hatte sich gezeigt, dass PCM-1 in einer *Cep290*^{-/-}-Zelllinie konzentrierter um die ziliäre Basis verteilt vorlag [46]. Dazu wurde in allen untersuchten Zelllinien der Quotient aus den Fluoreszenzsignalen von Pcm-1 an der ziliären Basis und einer den Großteil der Zelle umfassenden Fläche um die ziliäre Basis herum gebildet, was in Abbildung 23 illustriert ist.

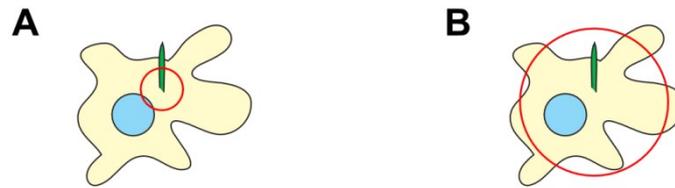


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Quantifizierung der Verteilung der Pcm-1-Fluoreszenzsignale innerhalb der Zelle (Zilium grün markiert). A: Quantifizierung der Signale an der Basis des Ziliums durch Selektion eines kleinen Kreises (rot) um die ziliäre Basis. B: Quantifizierung der Signale im Großteil der Zelle durch Selektion eines großen Kreises (rot) um die ziliäre Basis herum. Pcm-1, Perizentrioläres Material 1.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, zeigten sich hierbei größtenteils keine Unterschiede in der intrazellulären Lokalisierung von Pcm-1 in den untersuchten Zelllinien. Allerdings konnte in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie eine signifikant veränderte Verteilung von Pcm-1 verglichen mit allen anderen getesteten Zelllinien festgestellt werden, da der Quotient der Pcm-1-Fluoreszenzintensitäten im Vergleich mit diesen um etwa 25% verringert war. Demnach lag Pcm-1 hier geringer konzentriert an der ziliären Basis vor und war deshalb gleichmäßiger in der Zelle verteilt als in den anderen Zelllinien, einschließlich des Wildtyps. Folglich konnte eine veränderte intrazelluläre Lokalisierung von Pcm-1 nur in der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{Q1942X}#2-Zelllinie ermittelt werden.

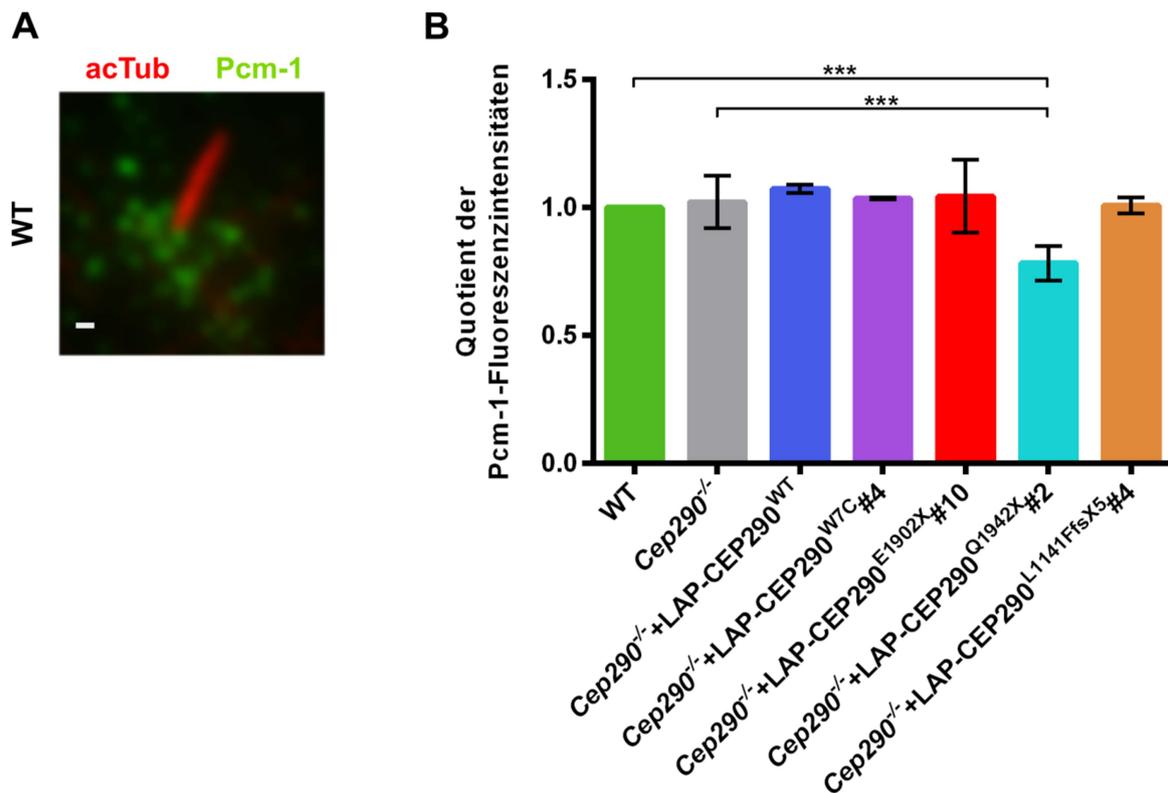


Abbildung 24: A: Immunfluoreszenzmikroskopie der wildtypischen IMCD3-Zelllinie mit acetyliertem Tubulin (acTub) als Zilienmarker in rot und dem CEP290-Interaktionspartner Pcm-1 in grün. Der Maßstab beträgt 1 μ m. B: Darstellung der auf die WT-Zelllinie normalisierten Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Pcm-1 an der ziliären Basis und einer den Großteil der Zelle umfassenden Fläche um die ziliäre Basis herum in den untersuchten Zelllinien. Die Standardabweichungen der gemittelten Werte sind jeweils angezeigt. $n \geq 2$ mit Quantifizierung von jeweils 30 Zellen. Statistische Analyse mittels Bonferroni-Test durch Vergleich der Mittelwerte aller Zelllinien miteinander, der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle Signifikanzniveaus angegeben. *** $p \leq 0,001$. Pcm-1, Perizentrioläres Material 1.

4.5. Bestimmung der Zilienlängen der WT-, Cep290^{-/-}- und Pcm-1^{-/-}-Zelllinie sowie der generierten CEP290-Zelllinien

Im letzten Teil der Arbeit sollte die durchschnittliche Länge der Zilien zwischen der WT-, Cep290^{-/-}- und Pcm-1^{-/-}-Zelllinie sowie den generierten CEP290-Zelllinien verglichen werden. So sollten mögliche Einflüsse auf die Ziliogenese untersucht werden. Die Bestimmung der Zilienlänge basierte hierbei auf den Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit dem Zilienmarker Arl13b (siehe Abbildung 22) und die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Als Resultat zeigte sich in der Cep290^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zu der WT-Zelllinie eine durchschnittlich gleiche Länge der Zilien von etwas mehr als 4 μ m, jedoch mit einer relativ großen Varianz. Auch in der Pcm-1^{-/-}-Zelllinie konnten ebenso wie in der erzeugten Cep290^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie keine Unterschiede ausgemacht werden. Dahingegen konnten in allen übrigen generierten CEP290-Zelllinien signifikant reduzierte Zilienlängen im

Vergleich zur WT-Zelllinie festgestellt werden, die durchschnittlich weniger als 4 μm betragen. Dabei fiel die Varianz in den gemessenen Zilienlängen bei allen ähnlich oder geringer als in der WT-Zelllinie aus. Zusammenfassend konnten so in den mutierten CEP290-Zelllinien signifikant reduzierte Zilienlängen festgestellt werden, wohingegen in der erzeugten $Cep290^{-/-}$ +LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie physiologische Zilienlängen beobachtet werden konnten. Ferner wiesen die $Cep290^{-/-}$ - und die $Pcm-1^{-/-}$ -Zelllinie keine veränderten Zilienlängen auf.

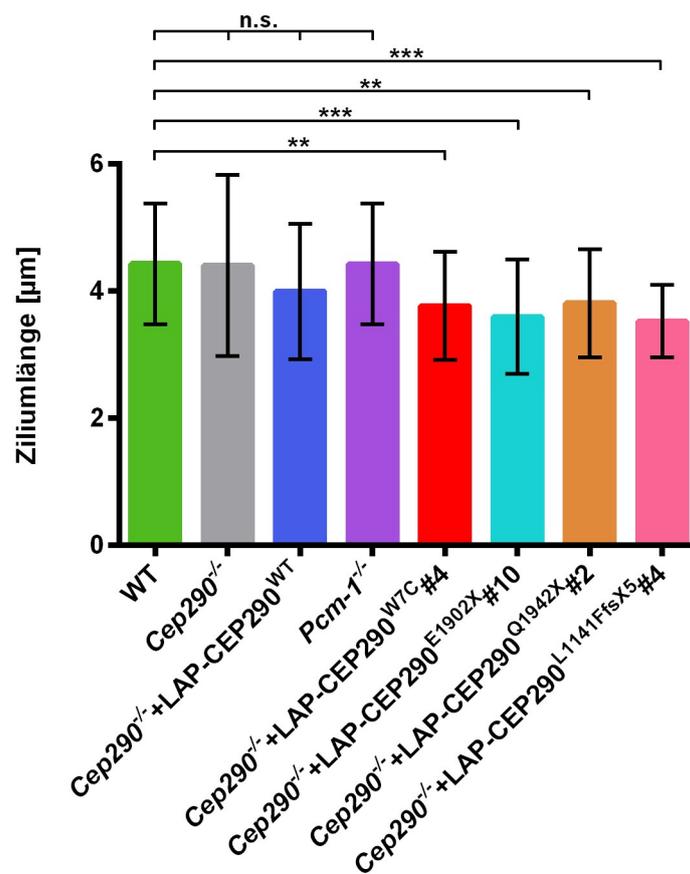


Abbildung 25: Darstellung der durchschnittlichen Ziliumlängen der WT-, $Cep290^{-/-}$ - und $Pcm-1^{-/-}$ -Zelllinie sowie der generierten CEP290-Zelllinien. $n \geq 2$ mit Vermessung von jeweils 30 Zilien. Statistische Analyse mittels Bonferroni-Test durch Vergleich der Mittelwerte aller Zelllinien miteinander, der Übersichtlichkeit halber sind nicht alle Signifikanzniveaus angegeben. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, n.s. = nicht signifikant.

5. Diskussion

5.1. Generierung und Validierung unterschiedlicher CEP290-Zelllinien

Die niedrige Transfektionseffizienz scheint vor allem durch die Plasmidgröße und die IMCD3-Zelllinie bedingt zu sein

Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden die erfolgreich in den *Destination*-Vektor einklonierten *CEP290* (*Centrosomal protein of 290 kDa*)-Varianten in eine *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie transfiziert. Dies gestaltete sich schwieriger als erwartet, da die Transfektionseffizienz bei dem zunächst durchgeführten *forward* Transfektionsansatz sehr gering ausfiel. So überlebten am Ende nur sehr wenige Klone die Hygromycin-Selektion. Eine mögliche Ursache für die Problematik war höchstwahrscheinlich die enorme Größe des zu transfizierenden Expressions-Vektors von ungefähr 14 kb, welche die Transfektionseffizienz deutlich verringern könnte. Zum anderen ist die gewählte Zelllinie, eine IMCD3-Zelllinie, generell schwieriger als beispielsweise HEK (*Human Embryonic Kidney*)-293- oder RPE-Zellen zu transfizieren. Beide Hypothesen konnten durch die parallel zur genaueren Quantifizierung der Transfektionsraten durchgeführten transienten, *reverse* Transfektionsansätze belegt werden, bei der neben der IMCD3-Zelllinie eine humane RPE-Zelllinie mit den Konstrukten *LAP-CEP290*^{WT} sowie *PKA-R1α-GFP* transfiziert wurde. Denn die deutlichen Differenzen in den Transfektionsraten der IMCD3-Zelllinie und der RPE-Zelllinie sprechen hierbei für eine geringere Transfektionseffizienz von IMCD3-Zellen gegenüber anderen Zelllinien. Darüber hinaus bestätigte sich beim Vergleich der Transfektionsraten von *LAP-CEP290*^{WT} und *PKA-R1α-GFP* auch, dass die Transfektionseffizienz durch die enorme Größe der LAP-getaggen *CEP290*-Varianten möglicherweise erheblich verringert wird.

Zur möglichen Verbesserung der Transfektionseffizienz wurden zudem *reverse* Transfektionsansätze zur Erzeugung der CEP290-Zelllinien durchgeführt. Dadurch konnten zwar weitere CEP290-Zelllinien gewonnen werden, aber die Transfektionseffizienz fiel immer noch gering aus. Daher wurde zusätzlich die Menge des Transfektionsreagenzes FuGENE® 6 erhöht, um die Effizienz der Transfektion zu erhöhen, und gleichzeitig mit der Hygromycin-Selektion bereits direkt nach der Transfektion begonnen, um den Selektionsdruck von Anfang an zu verstärken und somit die Generierung von falsch-positiven Klonen zu vermindern. Diese Änderungen resultierten in einer Optimierung der Transfektionseffizienz, so dass letztlich mindestens zwei Klone einer jeden CEP290-Zelllinie generiert werden konnten. Eine Ausnahme bildete dahingegen die *Cep290*^{-/-}+*LAP-CEP290*^{WT}-Zelllinie, bei welcher trotz mehrfacher Transfektionsversuche nur ein Pool von

Klonen gewonnen werden konnte, so dass hier eventuell auftretende klonale Unterschiede die nachfolgenden Analysen beeinflussen konnten. Abschließend lässt sich somit festhalten, dass mittels verändertem Protokoll eines *reverse* Transfektionsansatzes zwar eine deutliche Optimierung der stabilen Transfektionsraten erzielt werden konnte, hier jedoch noch weiterer Optimierungsbedarf besteht.

Im Allgemeinen können Transfektionsraten dabei auch durch die Wahl des Transfektionsreagenzes bzw. des Transfektionsverfahrens erheblich beeinflusst werden. Einen kritischen Schritt bei dem verwendeten Transfektionsreagenz FuGENE® 6 stellt beispielsweise die Bildung des FuGENE 6 Reagenz:DNA-Komplexes dar, die zeitlich mindestens 15 Minuten Inkubation in Anspruch nehmen sollte [43], hier wurde nach Herstellerangabe ein Zeitfenster von 30 Minuten gewählt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Penicillin und Streptomycin die Transfektionseffizienz mit FuGENE® 6 um bis zu 25% verringern kann [43], weshalb eine zusätzliche Option in der Wahl eines Antibiotikum-freien Mediums besteht, was in dieser Arbeit nicht ausgetestet wurde. Ferner stellt ein Elektroporation-basierter Transfektionsansatz eine Alternative dar, so konnte ein *GFP*-Plasmid mit Hilfe dieses Verfahrens mit einer hohen Transfektionsrate von 75% in humane RPE-Zellen eingebracht werden [82]. Ebenso wurde solch ein Verfahren bereits erfolgreich zur transienten und stabilen Transfektion von IMCD3-Zellen angewandt, auch wenn hierbei keine genauen Transfektionsraten bestimmt wurden sind [29,30].

Validierung des anti-hCEP290 Antikörpers

Zur Verifizierung der generierten CEP290-Zelllinien mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot musste zunächst ein geeigneter Antikörper verifiziert werden. Hierfür wurden anfangs gegen den *LAP-tag* gerichtete Antikörper untersucht, worunter zwei unterschiedliche anti-GFP und ein anti-S-*tag* Antikörper waren. Alle drei Antikörper zeigten jedoch ein unspezifisches Bandenmuster in allen untersuchten CEP290-Zelllinien und der *Cep290*^{-/-}-Negativkontrolle oder ließen gar keine distinkten Banden in den CEP290-Zelllinien erkennen. Da beim Testen des ersten aus der AG Nachury (Stanford, USA) stammenden anti-GFP Antikörpers noch keine Positivkontrolle mitgeführt wurde, lässt sich nicht genau evaluieren, ob das Problem der Erkennung eher am Antikörper oder an den untersuchten Ganzzelllysaten lag. Da dieser anti-GFP Antikörper in der AG Mick jedoch bereits erfolgreich eingesetzt wurde, lässt sich nur vermuten, dass das Problem womöglich in der Präparation der Lysate lag. Der zweite, kommerziell von Roche erhältliche anti-GFP Antikörper und der getestete anti-S-*tag* Antikörper erkannten dahingegen spezifisch den *LAP-tag* in einer als Positivkontrolle mitgeführten WT+MKS1-LAP-IMCD3-Zelllinie. Trotz dessen konnten in den exemplarisch untersuchten Ganzzelllysaten der generierten CEP290-Zelllinien wie beschrieben keine spezifischen Signale detektiert werden. Über die Ursache für das

Nichterkennen des LAP-tags aller getesteten Antikörper in den generierten CEP290-Zelllinien kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Es könnte beispielsweise die Antigenkonzentration, in dem Fall also der LAP-tag, in den Lysaten unter dem Detektionslimit der Antikörper gelegen haben. Hierfür könnte mutmaßlich eine zu geringe Expression des CEP290-Fusionsproteins in den Zellen verantwortlich gewesen sein. Ferner könnten die untersuchten Zelllinien falsch-positiv gewesen sein, auch wenn dies nach der Hygromycin-Selektion als unwahrscheinlichere Möglichkeit erscheint und diese These nachfolgend zumindest für die getestete *Cep290*^{-/-}-LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie eindeutig falsifiziert werden konnte.

Denn nachfolgend wurde ein gegen humanes CEP290 gerichteter Antikörper getestet und erfolgreich verifiziert. Dieser zeigte sowohl für murines Cep290 in der WT+MKS1-LAP-IMCD3-Zelllinie als auch für humanes CEP290 in der *Cep290*^{-/-}-LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie eine der erwarteten Größe entsprechende, distinkte Bande. In der Negativkontrolle konnte keine Bande in diesem Größenbereich detektiert werden. Allerdings zeigte der Antikörper insbesondere im niedermolekularen Bereich zahlreiche weitere, teils schwächere Banden auf, die auch in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie sichtbar waren. Das lässt darauf schließen, dass der Antikörper noch andere Proteine unspezifisch in den Ganzzelllysaten erkannte. Nichtsdestotrotz konnte so ein zum Zwecke der Verifizierung der CEP290-Zelllinien geeigneter Antikörper identifiziert werden.

Die Unterschiede in den Expressionsleveln der CEP290-Varianten sind womöglich auch auf divergente Proteinstabilitäten zurückzuführen

Zur Validierung der generierten CEP290-Zelllinien wurde der im vorangegangenen als geeignet verifizierte anti-hCEP290 Antikörper in Western Blot Analysen eingesetzt. Dabei wurden zur Ermittlung der Proteinstabilität der unterschiedlichen CEP290-Varianten sowohl Ganzzelllysate der CEP290-Zelllinien untersucht, welche nicht vorbehandelt wurden, als auch solche, die zuvor mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt wurden. Hierbei konnten erfolgreich Zelllinien für alle CEP290-Varianten mit den entsprechenden kalkulierten molekularen Massen identifiziert werden. Eine Ausnahme stellten hierbei einzig die beiden untersuchten Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie dar, bei der die stark verkürzte CEP290-Variante nicht detektiert werden konnte. Auch unter Zugabe des Proteasom-Inhibitors konnte diese Variante im Western Blot nicht detektiert werden. Ursächlich hierfür könnte ein vorzeitiger, intrazellulärer Abbau dieser CEP290-Variante bereits auf mRNA Ebene, der so genannte *mRNA Decay*, sein. Diese Annahme wird für verkürzende Mutationen in CEP290 als möglicher Mechanismus des Abbaus in Betracht gezogen [17]. Anschließend wurde eine Quantifizierung der Expressionslevel der erfolgreich detektierten CEP290-Varianten vorgenommen, welche unabhängig von der Zugabe des

Proteasom-Inhibitors zum Teil große Unterschiede in den Expressionsleveln der verschiedenen CEP290-Varianten ergab. Nur die beiden Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}-Zelllinie wiesen darüber hinaus auch ein deutlich unterschiedliches Expressionslevel der LAP-CEP290^{W7C}-Variante untereinander auf. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen CEP290-Varianten könnten auf eine unterschiedliche Expression der einzelnen CEP290-Varianten zurückgeführt werden. Da alle *CEP290*-Varianten jedoch in den *FipIn*-Locus der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie integriert worden sind und unter dem gleichen Promotor, EF-1 α , exprimiert wurden, erscheint diese Theorie eher unwahrscheinlich. Demzufolge könnten mögliche Unterschiede durch eine divergierende Proteinstabilität der einzelnen CEP290-Varianten begründet werden. Diese Hypothese wird durch den unterschiedlich stark ausgeprägten Anstieg der Expressionslevel der CEP290-Varianten unter Vorbehandlung mit MG132 untermauert. Einzig der Unterschied zwischen den beiden Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}-Zelllinie ist hierdurch nicht erklärbar und es kann lediglich vermutet werden, dass bei Klon 5 der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}-Zelllinie aufgrund des sehr hohen Expressionslevels der CEP290-Variante eine Mehrfachinsertion des *CEP290*-Konstrukts in den *FipIn*-Locus vorliegen könnte. Ferner fielen beim Vergleich der Expressionslevel der CEP290-Varianten mit dem wildtypisch exprimierten, murinen WT Unterschiede auf. So zeigten einige CEP290-Varianten ein höheres Expressionslevel, andere einschließlich der LAP-CEP290^{WT}-Variante dahingegen ein niedrigeres Level. Da es sich hierbei um den Vergleich zwischen CEP290-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen, Mensch und Maus, handelt, spielen hier artspezifische Unterschiede eventuell eine Rolle. Eine umfassende Studie des murinen Genoms von Yue *et al.* aus dem Jahre 2014 ergab, dass einerseits eine hohe Konservierung verglichen mit dem menschlichen Genom besteht, aber andererseits auch Unterschiede zwischen den Expressionsleveln von murinen und menschlichen Genen existieren [96]. Daneben könnte eine unterschiedliche Affinität des verwendeten anti-hCEP290 Antikörpers zum murinen Cep290 und zu den humanen CEP290-Varianten vorliegen, welches sich wiederum auf die Quantifizierung der Expressionslevel auswirken könnte [80]. Außerdem muss an dieser Stelle berücksichtigt werden, dass alle *CEP290*-Varianten unter der Kontrolle des artifiziellen Promotors EF-1 α stehen. Inwiefern die Expressionslevel somit dem physiologischen Niveau im menschlichen Organismus entsprechen kann daher nicht genau beurteilt werden. Die große Varianz zwischen den Expressionsleveln der einzelnen CEP290-Varianten trotz der Regulation durch den gleichen Promotor suggeriert jedoch, dass hier wie bereits vorangehend postuliert wahrscheinlich auch divergierende Proteinstabilitäten eine essentielle Rolle spielen. Dieser Aspekt putativ unterschiedlicher Proteinstabilitäten der CEP290-Varianten soll nachstehend noch in die Charakterisierung der CEP290-Zelllinien einfließen und dort noch genauer diskutiert werden (siehe Abschnitt 5.2.).

Mögliche Ursachen des falsch-positiven Klons und intrazelluläre Degradierung der LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Variante

Im Rahmen der Validierung der Klone der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie, deren CEP290-Varianten im Western Blot nicht detektiert werden konnten, stellte sich Klon 1 als falsch-positiv heraus. Die Ursache dafür könnte zum einen auf eine etwas zu niedrig gewählte Hygromycin-Konzentration im Medium zurückzuführen sein, da sich die Beurteilung der zur Selektion von ICMD3-Zellen benötigten minimalen Konzentration in Vorexperimenten als schwierig herausstellte. Für künftige Experimente könnte alternativ der Selektionsmarker Blasticidin zur Selektion verwendet werden [42]. Blasticidin bewirkt als nukleosidisches Antibiotikum die Inhibition der Proteinsynthese in Pro- und Eukaryoten [42] und wäre auch aufgrund seiner schnelleren Selektionsrate bei zukünftigen Transfektionsansätzen gegenüber Hygromycin zu bevorzugen. Zum anderen wäre auch die Ausbildung einer Resistenz dieses Klons gegenüber Hygromycin denkbar. Dahingegen konnte der Klon 4 der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Zelllinie als positiv verifiziert werden, da dieser die *frameshift*-Mutation aufwies. Im Umkehrschluss muss an dieser Stelle somit, wie vorangehend postuliert, angenommen werden, dass diese stark verkürzte Variante einer intrazellulären Degradierung unterliegt, höchstwahrscheinlich durch 1.) *mRNA Decay* oder aber 2.) starker proteasomaler Degradation. Deshalb konnte diese CEP290-Variante womöglich nicht auf Proteinebene detektiert werden.

Die mRNA-Expressionslevel der CEP290-Varianten bleiben unklar

Um die Hypothese einer potentiell divergierenden Proteinstabilität zwischen den unterschiedlichen CEP290-Varianten weiter zu belegen sowie der Klärung des starken Unterschieds in den Expressionsleveln der CEP290-Variante zwischen den beiden Klonen der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}-Zelllinie nachzugehen, wurde ein qPCR-basierter Ansatz verfolgt. Hierdurch sollten die Expressionslevel der CEP290-Varianten auf Transkriptionsebene ermittelt werden, um so Erkenntnisse über mögliche Unterschiede in der Expression oder aber der Proteinstabilität zwischen den CEP290-Varianten zu gewinnen. Dieser Ansatz scheiterte jedoch aufgrund der Verwendung von zumindest unter den gewählten Bedingungen zur spezifischen Amplifikation von *EGFP* ungeeigneten Primerpaaren, welche jedoch bereits zuvor erfolgreich in qPCR-basierten Ansätzen eingesetzt wurden [14,55]. Zur Lösung dieses Problems empfehlen sich die Selektion und die Prüfung weiterer Primerpaare. Alternativ könnte die Proteinstabilität der CEP290-Varianten auch mit Hilfe anderer, allerdings erheblich aufwendigerer Methoden wie z.B. einer dynamischen Differenzkalorimetrie (*in vitro*) [44] oder eines *Pulse-Chase*-Verfahrens (*in vivo*) [93] näher untersucht werden.

5.2. Charakterisierung der generierten CEP290-Zelllinien

Eine Übersicht über alle im Rahmen der Charakterisierung der zum Vergleich dienenden und in dieser Dissertation generierten IMCD3-Zelllinien erhaltenen Ergebnisse zeigt Tabelle 14.

Tabelle 14: Übersicht über alle in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Charakterisierung der zum Vergleich dienenden WT-, *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie sowie aller generierten CEP290-Zelllinien mit den jeweiligen assoziierten klinischen Phänotypen (blau markiert). Die WT-Zelllinie wurde bei den meisten Parametern mit untersucht und diente als Referenz (hellgrün markiert). Graue Markierungen kennzeichnen Zelllinien, welche in dieser Arbeit nicht bezüglich des aufgeführten Parameters analysiert wurden. Die Lokalisierung der CEP290-Varianten ist farbig codiert in korrekt lokalisiert (dunkelgrün), korrekt lokalisiert mit putativ zusätzlicher Fehllokalisierung (gelb) und nicht detektierbar (rot). *Die Proteininstabilität wurde im Rahmen der Generierung der CEP290-Zelllinien anhand der Potenzierung der Proteinlevel nach Behandlung mit MG132 bzw. der Signalintensitäten der Fusionsproteine in der Immunfluoreszenzmikroskopie festgestellt.

+ = erhöht, o = keine Änderung, - = vermindert bzw. bei der Lokalisierung von *Pcm-1* geringer konzentriert an der ziliären Basis (im Vergleich zur WT-Zelllinie). APEX, Ascorbatperoxidase-basiertes *Proximity Labelling*; Arl13b, *ADP-Ribosylation factor-like protein 13b*; BBS, Bardet-Biedl-Syndrom; CORS, *Cerebellooculorenal syndrome*; Fam92a1, *Family With Sequence Similarity 92 Member A1*; IF, Immunfluoreszenz-Mikroskopie; Ift88, Intraflagelläres Transportprotein 88 Homolog; JS, Joubert-Syndrom; LCA, Lebersche kongenitale Amaurose; *Pcm-1*, Perizentrioläres Material 1, SLS, Senior-Loken-Syndrom.

IMCD3-Zelllinie (assoziierter klinischer Phänotyp)	Proteininstabilität*	Wachstum	Lokalisierung der CEP290-Variante	Ziliäre Proteinlevel (IF/APEX)			Lokalisierung von <i>Pcm-1</i>	Zilienlänge
				Fam92a1	Ift88	Arl13b		
WT								
<i>Cep290</i> ^{-/-}		-		o	o/+	-	o	o
<i>Pcm-1</i> ^{-/-}				o	o/-	-		o
<i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{WT}	hoch	-		o	o	o	o	o
<i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP-CEP290 ^{W7C} (CORS/SLS)	hoch	-		o	o	-	o	-
<i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP- CEP290 ^{E1902X} (BBS)	mittel	-		o	o	-	o	-
<i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP- CEP290 ^{Q1942X} (JS)	gering	-		o	+	-	-	-
<i>Cep290</i> ^{-/-} +LAP- CEP290 ^{L1141FfsX5} (LCA)	sehr gering	-		+	o	-	o	-

5.2.1. Betrachtung der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie und der Vergleichs-Zelllinien

In diesem Abschnitt soll unter anderem untersucht werden, inwiefern die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie in seinen Charakteristika vergleichbar mit der murinen Wildtyp-Zelllinie ist. Somit sollte final beurteilt werden, ob die an einen LAP-*tag* fusionierten CEP290-Varianten prinzipiell funktionsfähig sind und folglich ein Vergleich der unterschiedlichen generierten CEP290-Zelllinien mit dem Wildtyp legitim ist. Zudem sollen im Vergleich zur WT-Zelllinie abweichende Charakteristika der *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie näher besprochen werden.

Im Unterschied zum kompletten Verlust von CEP290 führt die LAP-CEP290^{WT}-Variante zu einem deutlich eingeschränkten Wachstumsverhalten in IMCD3-Zellen

Bei der Betrachtung der Wachstumsraten fiel nur ein geringfügiger Unterschied zwischen der WT- und *Cep290*^{-/-}-Zelllinie auf. Dies impliziert, dass ein kompletter Verlust von CEP290 offenbar keinen großen Effekt auf die Wachstumsrate hat, obwohl CEP290 als wichtiger Bestandteil von Zentrosomen maßgeblich in die Regulation der Zellteilung involviert ist [88]. Dahingegen zeigte die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie ein deutlich verlangsamtes Wachstumsverhalten im Vergleich zur WT-Zelllinie, was daraufhin deutet, dass die Zellproliferation dieser Zelllinie durch die transfizierte wildtypische CEP290-Variante in unbekannter Weise inhibiert wird. Ein solcher Effekt wurde bei der Transfektion eines an EGFP (*enhanced GFP*) fusionierten wildtypischen CEP290 in IMCD3-Zellen nicht beschrieben [88]. Allerdings wurde abweichend zu dieser Arbeit eine wildtypische IMCD3-Zelllinie verwendet und keine *Cep290*^{-/-}-Zelllinie. Daher war zusätzlich wildtypisches nicht an GFP fusioniertes CEP290 in diesen Zellen vorhanden, was die normale Funktionalität des Proteins im Rahmen der Regulation der Zellteilung gewährleisten könnte und folglich zu einer normalen Wachstumsrate führen würde. Grundsätzlich bestehen somit drei Unterschiede zwischen einer wildtypischen IMCD3-Zelllinie und der generierten *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie: 1.) Der N-terminale LAP-*tag* an CEP290, 2.) der humane Ursprung des CEP290^{WT}-Proteins und 3.) der *Cep290*^{-/-}-Hintergrund. Ein Verlust von möglichen Interaktionen oder eine inkorrekte Faltung von CEP290 durch den N-terminalen LAP-*tag* und eine daraus resultierende Hemmung des Wachstums der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie wären hierbei durchaus denkbar. Zudem könnte der Hintergrund der Zelllinie hier ursächlich für die beobachtete Wachstumseinschränkung sein, da die *Cep290*^{-/-}-Zelllinie kein klassischer *knockout* ist, sondern ein CRISPR/Cas9-basiertes Verfahren zur Generierung angewandt wurde. Daher könnten potentiell auch so genannte *off-target*-Effekte eine Rolle spielen, welche durch die Endonuklease-Aktivität von Cas9 hervorgerufen werden

und bei Anwendung des Verfahrens in humanen Zelllinien vielfach beobachtet wurden [31]. Infolgedessen könnten theoretisch andere in die Zellteilung involvierte Gene bei der Generierung der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie in Form unterschiedlicher Mutationen beeinflusst worden sein, welche erst in Wechselwirkung mit der exprimierten CEP290-Variante zu dem beobachteten im Wachstum gehemmten Phänotyp führen.

Die LAP-CEP290^{WT}-Variante lokalisiert korrekt an der ziliären Basis und weist vermutlich eine hohe Proteinstabilität auf

Die Lokalisationsstudien ergaben, dass die exprimierte LAP-CEP290^{WT}-Variante in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie korrekt an der Basis des Ziliums lokalisiert vorlag. Auch wenn hier gleich mehrere GFP-Signale detektiert werden konnten, die mit der Lage der Transitions-Zone, der Mutter- bzw. Tochterzentriole oder den zentriolären Satelliten übereinstimmen könnten. Denn in der Literatur deckt sich diese Beobachtung einer multilokalen Expression von CEP290 als Element von Zentrosomen sowie als integraler Bestandteil der Transitions-Zone [32,88]. Außerdem kann im Hinblick auf die vergleichsweise starke Intensität der Fluoreszenzsignale in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine hohe Proteinstabilität der wildtypischen CEP290-Variante vermutet werden, insbesondere aufgrund des im ersten Teils der Arbeit festgestellten niedrigen Expressionslevels dieser Variante.

In Abwesenheit von Cep290 und Pcm-1 sind die ziliären Proteinlevel von Arl13b in IMCD3-Zellen signifikant verringert

Die Grundlage der Analyse der ziliären Proteinzusammensetzung stellte eine bereits in der AG Mick durchgeführte Studie zur *Cep290*^{-/-}-Zelllinie dar (Mick, unveröffentlicht). Hierbei ergaben sich erste Hinweise darauf, dass in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie unter anderem reduzierte Level der Proteine Fam92a1, Ift88 und Arl13b im Zilium vorlagen. Im Unterschied dazu konnten bei den in dieser Arbeit durchgeführten auf Immunfluoreszenz-basierenden Analysen der ziliären Proteinkomposition in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie keine signifikanten Veränderungen der Level von Fam92a1 und Ift88 im Vergleich zur WT-Zelllinie beobachtet werden. Ift88 wurde zusätzlich im Rahmen eines auf *Proximity Labelling*-basierenden Verfahrens untersucht, wobei hier sogar ein deutlich höheres Proteinlevel in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie detektiert wurde. Auch wenn die Effizienz der Aufreinigung der markierten, ziliären Proteine in diesem Experiment nicht sicher bestimmt werden konnte, fiel dieser Unterschied in den isolierten Proteinmengen sehr deutlich aus. In einer Studie mit CEP290-Mutanten des Modellorganismus *C. reinhardtii* zeigte sich ebenso eine Anreicherung des IFT-Komplexes B [18], wobei IFT88 eine Komponente dieses Komplexes darstellt [74]. Ursächlich hierfür könnte die von Craigie *et al.* postulierte Rolle von CEP290 im Zusammenhang mit dem IFT basierten Im- und Export von

Proteinen in das Zilium sein, so dass Ift88 womöglich durch fehlregulierte Transportprozesse im Zilium akkumulieren könnte. Nichtsdestotrotz lässt sich hier keine abschließende Aussage treffen, da die Ergebnisse der auf Immunfluoreszenz- und *Proximity Labelling*-basierenden Analysen voneinander abweichen. Einzig Arl13b zeigte sich verglichen mit der WT-Zelllinie auch in dieser Arbeit signifikant verringert in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie, genau wie in der vorangegangenen Studie (Mick, unveröffentlicht). Das in die Regulation des retrograden Transportes und die Ziliogenese involvierte Arl13b [63,73] könnte durch das Fehlen von Cep290 fehlreguliert nur noch vermindert im Zilium vorliegen und womöglich proximal der Transitions-Zone akkumulieren. Diese Annahme wird durch Li *et al.* belegt, welche eine Funktion von CEP290 als Teil der ziliären Barriere im Rückhalt von Arl13b im Zilium postulieren [51]. In diesem Zusammenhang könnte dann auch eine mögliche Fehlsteuerung des unter anderem durch Arl13b regulierten retrograden Transportes von Ift88 zur ziliären Basis erklärbar sein, was in der Folge zur im *Proximity Labelling*-Ansatz beobachteten Akkumulation von Ift88 im Zilium führen könnte.

In der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie konnte in den Analysen verglichen mit der WT-Zelllinie eine ähnlich starke Depletion von Arl13b im Zilium wie in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie beobachtet werden. Fam92a1 wies demgegenüber unveränderte ziliäre Level auf. Daneben zeigte sich Ift88 in der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie in der Immunfluoreszenz-basierten Analyse unverändert, in der *Proximity Labelling*-basierten Analyse konnte dahingegen jedoch eine starke Depletion der isolierten Proteinmenge verglichen mit der WT-Zelllinie beobachtet werden. Ausgehend von dieser inkongruenten Datenlage kann an dieser Stelle spekuliert werden, dass Ift88, begründet durch die sehr deutlich sichtbare Depletion im *Proximity Labelling*-Ansatz, eher vermindert als vermehrt in den Zilien der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie vorliegt. Darauf deutet auch die essentielle Rolle von PCM-1 bei der Assemblierung von Zentriolen und Mikrotubuli hin [19]. Denn durch das Fehlen von Pcm-1 könnte der IFT entlang der Mikrotubuli beeinträchtigt sein, womit eine verminderte ziliäre Ift88-Menge in der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie durchaus als plausibel zu bewerten wäre. Genau wie auch die starke Depletion des in die Ziliogenese und den retrograden Transport involvierte Arl13b [63,73] durch eine Fehlorganisation des Netzwerks aus Zentriolen bzw. Mikrotubuli erklärt werden könnte. Eine andere Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Immunfluoreszenz- und der *Proximity Labelling*-basierten Analysen der ziliären Ift88-Level wäre, dass die Immunfluoreszenz-basierte Analyse praktisch eine Momentaufnahme der ziliären Proteinkomposition erfasst. Dagegen wird bei der *Proximity Labelling*-basierten Analyse ein bestimmter Zeitraum erfasst [56], unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen von etwa 3 Minuten. Insofern könnten, wie in der Immunfluoreszenz-basierten Analyse ermittelt, in der Tat gleiche ziliäre Proteinmengen von Ift88 in der WT- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie vorliegen. Es wäre jedoch möglich, dass in der *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie kein Austausch mehr von Ift88 mit der Basis stattfindet, so dass

in der WT-Zelllinie insgesamt deutlich mehr des Proteins im Rahmen des *Proximity Labelling* biotinyliert und nachfolgend isoliert werden konnte.

In der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie konnten dahingegen keine signifikanten Änderungen der ziliären Abundanzen der aufgeführten Kandidatenproteine (Fam92a1, Ift88 und Arl13b) verglichen mit der WT-Zelllinie festgestellt werden. Folglich weist diese Zelllinie hinsichtlich der untersuchten Proteinlevel einen wildtypischen Phänotyp auf.

Die subzelluläre Verteilung von Pcm-1 ist nicht verändert

Die Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung des CEP290-Interaktionspartners Pcm-1 ergab keine signifikante Veränderung in der *Cep290*^{-/-}- und *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie verglichen mit der WT-Zelllinie. Dies widerspricht in Teilen der Literatur, da in einer Studie die Verteilung von PCM-1 in einer *Cep290*^{-/-}-Zelllinie untersucht wurde und dabei im Vergleich zu einer WT-Zelllinie eine Konzentrierung um die ziliäre Basis herum beobachtet wurde [46]. Die Diskrepanz in den Beobachtungen könnte durch unterschiedliche Ansätze der Quantifizierung der Pcm-1- bzw. PCM-1-Signale an der ziliären Basis und um diese herum begründet sein, wobei in dieser Arbeit verschiedene Ansätze getestet wurden und keine in einer signifikant veränderten Lokalisierung des CEP290-Interaktionspartners resultierte. Allerdings konnte die genaue Vorgehensweise bei der Quantifizierung von Kim *et al.* auch nicht eruiert werden [46]. Ferner bestanden Unterschiede dahingehend, dass zum einen Zellen einer mittels der reversen Transkriptase der humanen Telomerase immortalisierten RPE-Zelllinie untersucht wurden, weshalb artspezifische Differenzen eine Rolle spielen könnten. Zum anderen wurde zur gezielten Abschaltung der Expression von CEP290 RNA-Interferenz genutzt, womit es sich nicht um einen vollständigen *knockout* von CEP290 handelt. Dementsprechend sind die Ergebnisse nur bedingt mit der in dieser Arbeit analysierten mit CRISPR/Cas9 erzeugten *Cep290*^{-/-}-Zelllinie vergleichbar. Abschließend konnte die von Kim *et al.* publizierte mit der Depletion von CEP290 assoziierte konzentrierter um das Zentrosom herum vorliegende Verteilung von PCM-1 [46] somit in dieser Arbeit nicht verifiziert werden.

Die Zilienlängen zeigen sich unverändert

Bezüglich der Zilienlängen ergaben sich im Vergleich zur WT-Zelllinie weder Veränderungen bei der *Cep290*^{-/-}- und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie noch bei der generierten *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie. Das Fehlen von Cep290 bzw. Pcm-1 nimmt daher offenbar ebenso wenig wie die Präsenz der transfizierten *LAP-CEP290*^{WT}-Variante Einfluss auf die Länge der Zilien, welche einen, wenn auch nicht allumfassenden, Parameter der Ziliogenese darstellt. Obgleich eine Veränderung bei Abwesenheit von Cep290 und Pcm-1, am ehesten in Form einer verkürzten Zilienlänge der Zelllinien, durchaus möglich gewesen wäre. Denn sowohl CEP290 als auch

PCM-1 werden für die korrekte Lokalisierung der GTPase Rab8 im Zilium benötigt und sind somit für die korrekte Assemblierung der ziliären Membran von Bedeutung [46]. Folglich sind die beiden Proteine in die Ziliogenese involviert [46] und eine verkürzte Zilienlänge wurde bei der Untersuchung der Zilien im posterioren Notochord von *Noto*^{-/-} (*Homeobox protein notochord-knockout*)-Mutanten bereits mit einer abnormalen ziliären Struktur in Verbindung gebracht [6].

Abschließend lässt sich festhalten, dass die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie hinsichtlich aller untersuchten Charakteristika mit Ausnahme des Wachstumsverhaltens keine signifikanten Abweichungen verglichen mit dem Wildtyp aufwies. Infolgedessen erscheint ein Vergleich der generierten CEP290-Zelllinien mit der WT-Zelllinie legitim zur Betrachtung der Lokalisierung der CEP290-Varianten, der subzellulären Lokalisierung von Pcm-1, der ziliären Proteinlevel und der Zilienlängen.

5.2.2. Betrachtung der mit Ziliopathien assoziierten CEP290-Zelllinien

Nachfolgend sollen zunächst die Untersuchungsergebnisse des Wachstumsverhaltens, der subzellulären Lokalisierung von Pcm-1 sowie der Zilienlängen der generierten CEP290-Zelllinien gemeinsam diskutiert werden, welche sich größtenteils nicht zwischen den einzelnen Zelllinien unterscheiden (siehe Tabelle 14). Demgegenüber sollen die heterogeneren Ergebnisse der Untersuchung der Lokalisierung der CEP290-Varianten und der ziliären Proteinlevel der Kandidatenproteine im Anschluss gesondert anhand der unterschiedlichen Ziliopathie-Modelle besprochen werden.

Die Verminderung der Wachstumsraten der CEP290-Zelllinien korreliert nur partiell mit dem Schweregrad der Erkrankung

Bei der Interpretation der Wachstumsraten der mutierten CEP290-Zelllinien muss wie vorangehend erörtert berücksichtigt werden, dass bereits die *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{WT}-Zelllinie ein deutlich verringertes Wachstum verglichen mit der WT-Zelllinie zeigte. Daher lassen sich bei der Analyse der Wachstumsraten nicht eindeutig Effekte der in *CEP290* eingeführten Mutationen von den offenbar vorhandenen Effekten anderer vorangehend diskutierter Elemente der generierten Zelllinien differenzieren. Nichtsdestotrotz konnten in allen untersuchten Zelllinien verschieden stark reduzierte Wachstumsraten im Vergleich zur WT-Zelllinie festgestellt werden. Der Grund hierfür könnte in der Rolle von CEP290 bei der Zellteilung liegen, da das Protein als essentieller Bestandteil von Zentrosomen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellteilung einnimmt [88]. Somit könnte die Funktion der Zentrosomen durch die unterschiedlichen Mutationen in *CEP290*

gestört werden, woraus eine Fehlregulation der Zellteilung resultieren könnte. Diese Hypothese wird dadurch belegt, dass im Kontext des BBS gezeigt werden konnte, dass der Mangel eines anderen mit CEP290 interagierenden BBS-Proteins, BBS4 (*Bardet-Biedl syndrome 4 protein*) [97], in Säugerzellen zu einer gestörten Struktur und Funktion des Mikrotubuli-Netzwerks bzw. der Zentrosomen führt [47]. Gleichzeitig konnte eine deutliche Beeinträchtigung der Teilungsrate in den BBS4-depletierten Zellen beobachtet werden [47]. Ferner handelt es sich bei CEP290 wahrscheinlich um eine äußerst dynamische Komponente der Zelle, die abhängig vom Zellzyklus zwischen dem Zytoplasma und der Transitions-Zone transportiert wird [18,69]. Folglich wäre auch eine durch die Mutationen bedingte Einschränkung der Dynamik von CEP290 eine plausible Erklärung der beobachteten Wachstumseinschränkung. Als ein weiterführender Untersuchungsaspekt könnte diesbezüglich die Dynamik der an einen LAP-tag fusionierten und somit GFP exprimierenden CEP290-Varianten mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen analysiert werden [64].

Die CORS/SLS-Modell-Zelllinie wies die langsamste Wachstumsrate verglichen mit allen anderen CEP290-Zelllinien auf, was dazu passend mit dem höchsten Schweregrad des CORS verglichen mit allen anderen untersuchten Ziliopathien korreliert [23]. Allerdings besteht in der Zusammenschau mit den weiteren Ergebnissen der Wachstumsanalyse scheinbar keine bzw. nur eine sehr bedingte Korrelation zwischen dem Schweregrad des klinischen Phänotyps und der Einschränkung der Wachstumsrate. So zeigte sich die Wachstumsrate der LCA-Modell-Zelllinie stärker vermindert als die der JS-Modell-Zelllinie, obwohl sich die LCA klinisch relativ milde manifestiert und das JS dahingegen mit einem sehr schweren Phänotyp assoziiert wird [17]. Zudem zeigte die BBS-Modell-Zelllinie ein ähnlich vermindertes Wachstumsverhalten wie die JS-Modell-Zelllinie, trotz des wiederum erheblich unterschiedlichen Schweregrades der beiden Erkrankungen [17]. Allerdings stellt die Wachstumsrate nur einen Parameter zur Einschätzung der Zellvitalität dar. Ferner bestätigt sich in diesem Kontext ein auf die generierten Zelllinien an sich zurückzuführender inhibierender Effekt auf das Wachstum. Denn wie nachfolgend noch erörtert, konnte kein CEP290-Fusionsprotein in der LCA-Modell-Zelllinie detektiert werden. Somit müssten die Wachstumsraten theoretisch mit denen der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie vergleichbar sein, liegen jedoch deutlich darunter.

Nur in der JS-Modell-Zelllinie zeigt sich eine aberrante Verteilung des CEP290-Interaktionspartners Pcm-1 innerhalb der Zelle

Bezüglich der subzellulären Lokalisation von Pcm-1 konnte in der JS-Modell-Zelllinie als einziges eine signifikante Veränderung der Verteilung verglichen mit der WT-Zelllinie beobachtet werden. So war der Interaktionspartner Pcm-1 gleichmäßiger im Zytosol der

Zellen der JS-Modell-Zelllinie verteilt, dementsprechend also weniger stark an der ziliären Basis konzentriert. Dies impliziert, dass die Q1942X-Mutation in CEP290 womöglich direkt die Interaktionsstelle mit Pcm-1 betreffen könnte oder die Wechselwirkung der Interaktionspartner in anderer Weise beeinflusst. Diese Beobachtung wird wiederum durch eine Studie gestützt, die eine Verbindung zwischen dem JS sowie auch dem BBS und einer dislozierten Verteilung von Pcm-1 postuliert. Als zugrundeliegende Ursache werden die entsprechenden Mutationen in *CEP290* herangeführt, wodurch eine Fehlregulation der subzellulären Verteilung von PCM-1 durch CEP290 erfolgt [46].

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Pcm-1 in der BBS-Modell-Zelllinie war keine Änderung dieser verglichen mit der WT-Zelllinie sichtbar. Dahingegen zeigte sich zumindest in mit PCM-1 interagierenden *BBS4*-Mutanten eine veränderte Verteilung des CEP290-Interaktionspartners in Form einer kompletten Fehllokalisierung von PCM-1 als im Zytoplasma gelegene Granula [47]. Da in der verwendeten HeLa-Zelllinie endogen noch das wildtypische BBS4-Protein exprimiert wurde, postulieren die Autoren einen dominant-negativen Effekt der aus diesen *BBS4*-Mutationen resultierenden verkürzten Proteinvarianten von BBS4 [47]. Bezugnehmend auf die in dieser Arbeit untersuchte BBS-Mutation E1902X in CEP290 konnte kein solcher Effekt auf die Verteilung von Pcm-1 festgestellt werden. Daher kann an dieser Stelle die Vermutung aufgestellt werden, dass die Interaktionsstelle mit Pcm-1 wahrscheinlich N-terminal vor der zu einer Verkürzung führenden Mutation E1902X in CEP290 liegen muss.

Des Weiteren ergab sich kein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied der Pcm-1-Verteilung in der CORS/SLS-Modell-Zelllinie verglichen mit der WT-Zelllinie. Daher scheint diese Mutation in *CEP290* keinen großen Einfluss auf die Interaktion mit Pcm-1 zu besitzen oder aber einen Effekt zu haben, der sich nicht in einer veränderten Konfiguration der Pcm-1-Verteilung in der Zelle widerspiegelt. Ebenso wurde bei der LCA-Modell-Zelllinie kein Unterschied im Vergleich zur WT-Zelllinie festgestellt. Daraus folgernd scheint die nachfolgend noch im Detail erörterte in einer fehlenden bzw. stark verminderten Expression von CEP290 resultierende Mutation L1141FfsX5, keine aberrante Verteilung des Interaktionspartners in der Zelle zu bewirken. Diese Beobachtung ist kongruent mit der unveränderten Pcm-1-Verteilung in der *Cep290*^{-/-}-Zelllinie, wo ebenfalls kein CEP290-Protein exprimiert wird und somit eine Vergleichbarkeit zu der hier untersuchten LCA-Modell-Zelllinie gegeben ist.

Alle CEP290-Zelllinien weisen verringerte Zilienlängen auf, welche womöglich auf eine aberrante Regulation durch vermindertes Arl13b zurückzuführen sind

Die Untersuchung der Zilienlängen ergab eine in allen mutierten CEP290-Zelllinien festgestellte signifikante Reduktion der Zilienlängen. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Ziliogenese offenbar negativ durch die mutierten CEP290-Varianten beeinflusst wird. Der Grund hierfür liegt womöglich darin, dass CEP290 als wichtiger Teil der höchstwahrscheinlich maßgeblich an der Regulation der Ziliogenese beteiligten Transitions-Zone eine entscheidende Rolle spielt [51]. Die eingeführten Mutationen in *CEP290* könnten einen mit einer Funktionsstörung einhergehenden Defekt der Transitions-Zone bewirken. Daneben könnte auch das in die Ziliogenese involvierte Arl13b als Ursache der verringerten Zilienlänge in Betracht kommen [73]. Denn in den Zilien aller mutierten CEP290-Zelllinien konnten reduzierte Proteinlevel von Arl13b ausgemacht werden. Das wiederum könnte in einer aberranten Regulation durch Arl13b resultieren, welche zur Inhibition des Längenwachstums der Zilien führen könnte. Die These einer gestörten Ziliogenese aufgrund einer Fehlregulation durch Arl13b wird auch von Shimada *et al.* bei der Pathogenese des JSRD angenommen [79]. Das JSRD kann ebenfalls durch Mutationen in *CEP290* bedingt sein und bezeichnet ein Joubert-Syndrom mit einer Manifestation außerhalb des ZNS [76]. Allerdings konnten in der Studie von Shimada *et al.* in JSRD-Fibroblasten sogar signifikant verlängerte Zilien im Vergleich zu wildtypischen Kontroll-Zelllinien festgestellt werden [79]. Außerdem konnte im Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit bei der Untersuchung von aus Patienten stammenden LCA-Fibroblasten mit unterschiedlichen Mutationen in *CEP290* verglichen mit wildtypischen Zellen kein signifikanter Unterschied der Zilienlängen detektiert werden [79]. Darüber hinaus zeigte das ebenfalls in die Regulation der Ziliogenese involvierte Pcm-1 außer in der JS-Modell-Zelllinie zumindest hinsichtlich seines Verteilungsmusters keine Auffälligkeiten [46], was nochmals die essentielle Bedeutung von CEP290 bei der Ziliogenese hervorhebt.

5.2.2.1. CORS/SLS Modell von CEP290

Die mutmaßlich hochstabile LAP-CEP290^{W7C}-Variante könnte eine partielle Fehllokalisierung im Ziliumschaft aufweisen

Die Lokalisationsanalyse der mit *LAP-CEP290^{W7C}* transfizierten *Cep290^{-/-}*-Zelllinie ergab eine korrekt an der Basis des Ziliums gelegene Lokalisation der CEP290-Variante. Auch wenn ein weiteres Signal ermittelt wurde, welches potentiell noch in der Transitions-Zone, allerdings auch fehllokalisiert im Bereich des Schafts liegen könnte. Daher wäre es möglich, dass ein geringer Anteil dieser CEP290-Variante falsch distal der Transitions-Zone lokalisiert, was

allerdings noch genauer eruiert werden müsste. Eine wildtypische Lokalisation stimmt dabei mit den Ergebnissen von Valente *et al.* überein, die ebenfalls ein an GFP fusioniertes CEP290 mit der Mutation W7C hinsichtlich seiner Lokalisierung untersucht haben und eine korrekte Lage nachweisen konnten [88]. Deshalb wird der Mechanismus der Pathogenese auch nicht in einer aberranten Lokalisation gesehen [88] und der schwerwiegende Phänotyp des CORS bzw. auch des SLS muss eine andere Ursache haben. Hierbei wäre zum Beispiel eine durch die *missense*-Mutation bedingte Hemmung einer essentiellen Interaktion von CEP290 mit anderen Proteinen denkbar. Dies impliziert auch eine Studie von Delous *et al.*, die bei zwei zum CORS führenden Mutationen in dem Transitions-Zonen-Protein RPGRIP1L eine verminderte Bindung von RPGRIP1L an dessen Interaktionspartner Nephrocystin-4 beobachtet haben und darin einen möglichen Grund für die Symptomatik des CORS vermuten [23]. Ferner suggerieren die relativ starken Signale des Fusionsproteins in der Immunfluoreszenz eine hohe Proteinstabilität der LAP-CEP290^{W7C}-Variante. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinlevel im ersten Teil der Arbeit gestützt, da Klon 4 der *Cep290*^{-/-}+LAP-CEP290^{W7C}-Zelllinie trotz vergleichsweise niedrigem Expressionslevel der CEP290-Variante sehr deutliche, distinkte Signale in der Immunfluoreszenz zeigte. In Zusammenschau mit den Proteinleveln nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 konnte nur bei Klon 4 eine Verdopplung des Proteinlevels festgestellt werden. In Klon 5 konnte dahingegen sogar eine Reduktion des Proteinlevels festgestellt werden, wofür möglicherweise zytotoxische Effekte von MG132 verantwortlich sein könnten [94]. Folglich spricht dies höchstens für eine geringgradige Instabilität der LAP-CEP290^{W7C}-Variante und korreliert daher mit den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz bezüglich der putativen Stabilität.

Die reduzierten Level von Arl13b in den Zilien der CORS/SLS-Modell-Zelllinie deuten auf eine gestörte Diffusionsbarriere hin

Die Untersuchung der Proteinlevel der Kandidatenproteine in der CORS/SLS-Modell-Zelllinie ergab für Fam92a1 und Ift88 keine signifikanten Änderungen verglichen mit der WT-Zelllinie. Die Kongruenz der integralen Komponente Fam92a1 deutet daraufhin, dass die Architektur der Transitions-Zone trotz des schweren klinischen Phänotyps zumindest noch partiell intakt ist. Ferner scheint zudem auch noch eine physiologische Regulation des IFT-basierten Transportes zumindest bezogen auf einer seiner wesentlichen Komponenten, Ift88, welches in unveränderter Menge im Zilium vorlag, zu erfolgen. Allerdings könnten mögliche Veränderungen des IFT hierbei beispielsweise mittels eines neuartigen Live-Cell-Imaging-Verfahrens genauer überprüft werden, womit auch die Dynamik von einzelnen IFT-Proteinen an der ziliären Basis analysiert werden kann [95]. Demgegenüber zeigte sich das ziliäre Proteinlevel von Arl13b in der CORS/SLS-Modell-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie

erheblich verringert. Die veränderten Arl13b-Level deuten auf einen Defekt der ziliären Barriere bzw. auf eine irreguläre Funktion der LAP-CEP290^{W7C}-Variante in der Transitions-Zone als Teil dieser Diffusionsbarriere hin [51]. Infolgedessen hätte erwartet werden können, dass dadurch der unter anderem durch Arl13b regulierte retrograde Transport im Zilium eingeschränkt ablaufen und somit eine Akkumulation des untersuchten Ift88 stattfinden würde. Eine plausible Erklärung für die in dieser Arbeit nachgewiesene unveränderte Abundanz von Ift88 wäre, dass weitere Regulatoren des IFT wie z.B. INPP5E (Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase E) [63] zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Status ausreichen. Daher lässt sich anhand der insgesamt ermittelten Veränderungen in den Proteinleveln bzw. hinsichtlich der putativen Proteinstabilität dieser CEP290-Variante noch kein direkter Anhaltspunkt für den schwerwiegenden Phänotyp des CORS bzw. des sich etwas milder präsentierenden SLS ausmachen.

5.2.2.2. BBS Modell von CEP290

Die LAP-CEP290^{E1902X}-Variante lokalisiert korrekt an der ziliären Basis und scheint einen hohen Turn-Over aufzuweisen

Die Lokalisationsstudie der BBS-Modell-Zelllinie konnte eine korrekte Lokalisation der LAP-CEP290^{E1902X}-Variante an der ziliären Basis nachweisen. Die Abtrennung des C-terminal von der Mutation gelegenen bipartiten nukleären Lokalisationssignals könnte allerdings zu einer hier nicht näher untersuchten fehlenden Lokalisation von CEP290 im Zellkern führen. In der vorangehend herangezogenen Studie zur Charakterisierung von BBS4-Mutanten konnte im Vergleich dazu gezeigt werden, dass eine ordnungsgemäße Lokalisation abhängig von der deletierten Region im Protein ist. So führte das Fehlen von C-terminalen Regionen im Gegensatz zum Fehlen des N-Terminus bei BBS4 nicht zu einer Fehllokalisierung [47]. In der erzeugten BBS-Modell-Zelllinie kommt es durch die Mutation bedingt ebenfalls zu einer C-terminal verkürzten CEP290-Variante, wodurch die Lokalisation von CEP290 in ähnlicher Weise regionsabhängig von der N-terminalen Region in CEP290 determiniert werden könnte. Abgesehen davon ist die korrekte Lokalisierung von CEP290 in der Zelle daneben bekanntermaßen vom BBSome abhängig [97]. Eine weitere Beobachtung in der BBS-Modell-Zelllinie war darüber hinaus allerdings, dass die Signalstärke der LAP-CEP290^{E1902X}-Variante in der Immunfluoreszenz vergleichsweise gering ausfiel. Ursächlich hierfür könnte möglicherweise eine verringerte Expression der CEP290-Variante sein, welche sich allerdings bei der vorangegangenen Analyse der Proteinlevel der unterschiedlichen CEP290-Varianten als vergleichsweise hoch heraus gestellt hatte. Daraus schlussfolgernd wäre es durchaus denkbar, dass diese CEP290-Variante zwar in korrekter Lokalisation im Zilium

eingebaut wird, jedoch aufgrund verminderter Stabilität und damit verbundener Degradation einem hohen Turn-Over unterliegt. Da nach Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 lediglich bei einer der beiden Klone der BBS-Modell-Zelllinie ein leichter Anstieg der Proteinlevel der CEP290-Variante beobachtet werden konnte, scheint der Abbau hier hauptsächlich über nicht-proteasomale Degradierung zu erfolgen. Ein solcher nicht-proteasomaler Abbauweg wurde bereits in HEK-293-Zellen beschrieben [15].

Stark verminderte ziliäre Arl13b-Level in der BBS-Modell-Zelllinie führen zu Störungen der ziliären Barriere sowie einer fehlerhaften Ausbildung des ziliären Axonems

Die Analyse der ziliären Proteinlevel in der BBS-Modell-Zelllinie zeigte keine signifikanten Veränderungen für Fam92a1 und Ift88 im Vergleich zur WT-Zelllinie, dahingegen jedoch ein um circa 50% und somit hochgradig verringertes ziliäres Arl13b-Level. Aufgrund der unveränderten Fam92a1-Level im Zilium scheint dieses in der Transitions-Zone lokalisierte Protein zumindest hinsichtlich seiner ziliären Abundanz nicht durch die BBS-Mutation beeinflusst zu werden. Arl13b ist durch die Interaktion mit Tubulin auch an der Regulation der Ziliogenese beteiligt [73]. Daher könnte die deutliche Reduktion der ziliären Arl13b-Level den Phänotyp des BBS zumindest teilweise erklären. So könnte der IFT zwar noch in physiologischer Weise funktionieren, auch wenn die Betrachtung der hier unveränderten Einzelkomponente Ift88 wie erwähnt nur einen Hinweis auf diese These gibt. Allerdings könnten andere Signalwege, beispielweise durch die fehlerhafte Ausbildung des ziliären Axonems, erheblich gestört sein. Hierbei wäre insbesondere die Untersuchung der Hedgehog-, Wnt- und Notch-Signalwege von Interesse, da Veränderungen in diesen für die Zystenbildung, welche auch bei BBS-Patienten in Form von Zystennieren auftreten, verantwortlich gemacht werden [85]. Daneben weist die starke Reduktion der ziliären Arl13b-Level auf eine möglicherweise massiv in seiner Funktion beeinträchtigte ziliäre Barriere hin [51], wodurch weitere im Zilium lokalisierte Proteine hinsichtlich ihrer Abundanz aberrant vorliegen könnten.

5.2.2.3. JS Modell von CEP290

Die untersuchte JS-Mutation führt zur Instabilität der CEP290-Variante, die einer proteasomalen Degradation unterliegt

Die LAP-CEP290^{Q1942X}-Variante in der JS-Modell-Zelllinie konnte in der Lokalisationsanalyse korrekt in der putativ angenommenen Lage der Transitions-Zone im Zilium ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu konnte in vorangegangenen Studien unabhängig von der genauen Art der Mutation in CEP290 SDS-PAGE- und Western Blot-basiert kein

CEP290-Protein in den Fibroblasten von JSRD-Patienten detektiert werden [26,79]. Da das JSRD, wie bereits erwähnt ein Joubert-Syndrom mit einer Manifestation außerhalb des ZNS beschreibt [76], ist hierbei anzumerken, dass es nicht gänzlich mit dem in dieser Arbeit untersuchten JS vergleichbar ist, sondern phänotypisch eher mit dem CORS vergleichbar wäre. Außerdem könnten in diesem Kontext auch Zelltyp-spezifische Unterschiede (Nierenepithel vs. Fibroblasten) mögliche Differenzen begründen. Da die hier untersuchte zum JS führende Mutation verglichen mit der BBS verursachenden E1902X Mutation C-terminal von dem bipartiten nukleären Lokalisationssignals liegt, müsste CEP290 in der Zelllinie zumindest theoretisch zusätzlich auch noch korrekt im Zellkern lokalisieren. Eine intranukleäre Lokalisation der CEP290-Varianten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Problematisch könnte hierbei allerdings sein, dass die ohnehin schon schwachen Fluoreszenzsignale der Fusionsproteine im Zytosol durch die Kernhülle noch weiter abgeschwächt werden könnten. Daher könnte die Detektion von Fluoreszenzsignalen im Zellkern misslingen, wenn die Intensität der Signale unterhalb der durch die Hintergrundfluoreszenz bedingten Detektionsschwelle liegt. Ferner präsentierten sich die GFP-Signale im Zilium in der JS-Modell-Zelllinie vergleichsweise etwas schwächer als beispielsweise in der CORS/SLS-Modell-Zelllinie, was wie bereits bei der BBS-Modell-Zelllinie diskutiert auf einen hohen Turn-Over dieser Variante hindeuten könnte. Diese Hypothese wird durch die Quantifizierung der Proteinlevel der LAP-CEP290^{Q1942X}-Variante ohne und unter Zugabe von MG132 belegt, da diese nach Behandlung der Klone der JS-Modell-Zelllinie mit dem Proteasom-Inhibitor verglichen mit den anderen CEP290-Varianten am stärksten um einen 4 bzw. 44fachen Faktor angestiegen sind. Dies spricht für eine hochgradige Instabilität dieser CEP290-Variante. Somit wäre der Schweregrad der Symptomatik hier auch nicht durch eine gravierende Fehllokalisierung der CEP290-Variante begründbar, sondern könnte vielmehr in der thermodynamischen Instabilität dieser CEP290-Variante liegen.

Signifikant erhöhte ziliäre Ift88-Level in der JS-Modell-Zelllinie implizieren einen Defekt des IFT

Bei der Untersuchung der ziliären Level der Kandidatenproteine stellte sich in der JS-Modell-Zelllinie heraus, dass das Transitions-Zonen-Protein Fam92a1 in unveränderter Menge in den Zilien vorlag. Dies deutet auf eine intakte Integrität der Struktur der Transitions-Zone hin, wie auch Shimada *et al.* bei der Untersuchung der Transitions-Zone in Zilien von Fibroblasten aus am JSRD leidenden Patienten postulieren [79]. Obgleich Shimada *et al.* nicht direkt die ziliäre Abundanz von Fam92a1, sondern die weiteren Komponenten der Transitions-Zone RPGRIP1L und TMEM67 (*Transmembrane protein 67*) hinsichtlich ihrer Lokalisation mittels Immunfluoreszenz untersucht haben, konnten sie doch ebenso keine

Veränderungen feststellen [79]. Im Unterschied dazu zeigte sich das ziliäre Ift88-Level in der JS-Modell-Zelllinie gegenüber allen Vergleichs-Zelllinien wie auch den anderen generierten CEP290-Zelllinien als signifikant erhöht. Folglich könnte der IFT gravierend gestört sein, wobei Defekte im ziliären und axonalen Transport durch eine gestörte Ausbildung axonaler Verbindungen mit Fehlbildungen des Stamm- und Kleinhirns bei JS-Patienten assoziiert sein könnten [88]. Im Gegensatz dazu konnten Shimada *et al.* keine signifikant reduzierten Proteinlevel von IFT-Proteinen, einschließlich IFT88, in den Fibroblasten von JSRD-Patienten detektieren und gehen daher nicht von einem defekten IFT aus [79]. Die ziliären Arl13b-Level zeigten sich vergleichsweise gering reduziert in der JS-Modell-Zelllinie, was eine wenn auch eher geringfügigere Einschränkung der ziliären Barriere, des retrograden Transportes bzw. der Ziliogenese suggeriert. In einer vorangegangenen Studie konnte damit korrelierend ebenso ein verringertes ziliäres Arl13b-Level in Fibroblasten von JSRD-Patienten festgestellt werden, weshalb ein möglicher Zusammenhang zwischen einem verringerten Zilienbesatz der Zellen, einem Parameter der Ziliogenese, und einer abnormalen Regulation durch Arl13b postuliert wird [79].

5.2.2.4. LCA Modell von CEP290

Höchstwahrscheinlich durch intrazellulären *mRNA Decay* bedingt kann die LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Variante nicht detektiert werden

In der Lokalisationsanalyse der CEP290-Varianten konnte die LAP-CEP290^{L1141FfsX5}-Variante in der LCA-Modell-Zelllinie nicht detektiert werden. Es konnte lediglich ein mit der Stärke des Hintergrundsignals der Negativkontrolle vergleichbares, diffuses Signal im GFP-Kanal erfasst werden. Folglich scheint diese CEP290-Variante entweder vollständig zu fehllokalisieren, überhaupt nicht auf mRNA-Ebene exprimiert oder die transkribierte mRNA intrazellulär abgebaut zu werden. Anknüpfend an den ersten Diskussionsteil konnte jedoch ermittelt werden, dass diese *CEP290*-Variante transkribiert wird und somit ein vorzeitiger, intrazellulärer Abbau bereits auf mRNA Ebene, der so genannte *mRNA Decay*, in hohem Maße wahrscheinlich ist. Denn die L1141FfsX5-Mutation führt, verglichen mit den anderen untersuchten Mutationen in CEP290, zur stärksten Verkürzung des Proteins um etwa die Hälfte. Ferner spricht hierfür, dass auch die Vorbehandlung der Zelllinie mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 keine Detektion der CEP290-Variante erbrachte und diese somit höchstwahrscheinlich überhaupt nicht oder nur in sehr geringem Maße auf Proteinebene exprimiert wird. Zumindest theoretisch würde die CEP290-Variante hierbei aufgrund der starken Verkürzung vermutlich nur eine äußerst geringe Proteinstabilität aufweisen. Die L1141FfsX5-Mutation in CEP290 zeigt mit der LCA einen vergleichsweise milden klinischen

Phänotyp [17]. Daher kann an dieser Stelle vermutet werden, dass der vorzeitige Abbau dieser stark verkürzten Proteinvariante *in vivo* offenbar zu einem weniger schwerwiegenden klinischen Phänotyp führt als die auf Proteinebene detektierbaren anderen untersuchten CEP290-Varianten, die im Menschen schwerwiegendere Krankheitsbilder verursachen. Diese Annahme wird durch eine 2006 von den Hollander *et al.* durchgeführte Analyse von CEP290-Mutationen in Patienten, welche an einer LCA leiden, gestützt. In dieser wurde unter anderem eine Mutation in CEP290 identifiziert, welche zu einem aberranten Spleißprodukt und dem Einbau eines vorzeitigen Stoppcodons führt [24]. Hierbei konnte die daraus resultierende verkürzte cDNA ebenfalls nicht in den Patienten nachgewiesen werden, jedoch noch eine geringe Menge der wildtypischen CEP290-cDNA detektiert werden [24]. Damit übereinstimmend wurde in einer weiteren Studie in Fibroblasten aus an LCA leidenden Patienten noch eine Restmenge des wildtypischen CEP290 von 20-50% im Vergleich mit wildtypischen Fibroblasten ermittelt, was auf hypomorphe, die Spleißstellen betreffende, Mutationen in CEP290 zurückgeführt wird [79]. In diesem Kontext wird in der Literatur einvernehmlich angenommen, dass die Aktivität des noch vorhandenen wildtypischen CEP290-Proteins ausreicht, um die Funktionen des Kleinhirns und der Nieren aufrechtzuerhalten, diese jedoch unzureichend für die ordnungsgemäße Funktion der Photorezeptoren ist und somit zur LCA führt [24,58]. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei der L1141FfsX5-Mutation nicht um eine hypomorphe Mutation, weshalb eigentlich keinerlei wildtypisches CEP290 exprimiert werden kann. Auch Shimada *et al.* haben LCA-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Einbau eines Stoppcodons führen, in Fibroblasten untersucht und konnten kein wildtypisches CEP290 detektieren. Somit bleibt die Frage hier offen, warum der Phänotyp bei diesen LCA-Mutationen klinisch ebenso milde ausfällt. Denn das in den untersuchten Nierenepithelzellen (IMCD3-Zellen) nachgewiesene vollständige Fehlen von CEP290 führt *in vivo* höchstwahrscheinlich zu einer schwerwiegenden Störung der Nierenfunktion, die bei der LCA typischerweise nicht vorliegt [24,91].

Eine Veränderung der Transitions-Zonen-Struktur in den Zilien der LCA-Modell-Zelllinie durch erhöhte Abundanz von Fam92a1 führt scheinbar zu einem gestörten IFT

In Bezug auf die Analyse der ziliären Proteinlevel in der LCA-Modell-Zelllinie konnte ein signifikant erhöhtes Level von Fam92a1 gegenüber allen anderen untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Daher scheint die strukturelle Integrität der Transitions-Zone durch diese Mutation verändert zu werden. Eine mögliche Hypothese wäre hier, dass die Expression des Transitions-Zonen-Proteins Fam92a1 aufgrund des postulierten vorzeitigen Abbaus von CEP290 auf mRNA-Ebene kompensatorisch gesteigert wird. Ob Fam92a1 die ziliäre Barrierefunktion zumindest partiell ersetzen kann ist aber eher fraglich. So konnte in der LCA-Modell-Zelllinie zwar keine signifikante Erhöhung der ziliären Ift88-Level gegenüber der

WT-Zelllinie ermittelt werden, doch zumindest gegenüber der *Cep290*^{-/-}, *Pcm-1*^{-/-} sowie der CORS/SLS- und der BBS-Modell-Zelllinie. Dies suggeriert einen zumindest leichtgradig gestörten IFT, welcher bei der Pathogenese der retinalen Degeneration eine Rolle spielt [28]. Außerdem spricht die signifikante Reduktion der ziliären Arl13b-Level in der LCA-Modell-Zelllinie für eine Störung des retrograden Transportes als Teil des IFT und einen möglichen Defekt der ziliären Barriere, in dessen Folge Arl13b wie vorangegangen postuliert proximal der Transitions-Zone akkumulieren könnte. Hierzu abweichend konnte in den Fibroblasten eines LCA-Patienten kein Unterschied in den ziliären Arl13b-Leveln im Vergleich zu einer WT-Zelllinie festgestellt werden [79]. Um der Hypothese einer möglichen Störung des IFT in der LCA-Modell-Zelllinie genauer nachzugehen, könnte wiederum das bereits vorangehend genannte Live-Cell-Imaging-Verfahren genutzt werden [95].

Zusammenfassend betrachtet konnten in dieser Arbeit erfolgreich fünf stabile IMCD3-Zelllinien generiert und validiert werden, welche neben einer wildtypischen CEP290-Variante mutierte CEP290-Varianten exprimierten, die klinisch zum CORS/SLS, BBS, JS und LCA führen. CEP290 nimmt als integraler Bestandteil der Transitions-Zone eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Ziliopathien ein [7,32], weshalb die Charakterisierung der generierten CEP290-Zelllinien und der zum Vergleich dienenden *Cep290*^{-/-} und *Pcm-1*^{-/-}-Zelllinie die genauen Mechanismen der molekularen Pathogenese näher beleuchten sollten. Zum einen konnten hierbei anscheinend deutlich divergierende Stabilitäten der unterschiedlichen CEP290-Varianten ausgemacht werden. Zum Anderen zeigten sich alle CEP290-Zelllinien in ihrem Wachstum signifikant eingeschränkt, wobei das Ausmaß der beobachteten Verminderung der Wachstumsraten nicht direkt mit dem klinisch beschriebenen Schweregrad der Erkrankung korrelierte [17]. Zudem konnte neben einer zumindest partiellen Fehllokalisierung der CEP290-Variante in der CORS/SLS-Modell-Zelllinie ein vollständiges Fehlen der CEP290-Variante in der LCA-Modell-Zelllinie ermittelt werden, welche höchstwahrscheinlich auf einen vorzeitigen Abbau der mRNA dieser Variante zurückzuführen ist. Darüber hinaus deuten die Analysen zur ziliären Proteinkomposition der CEP290-Zelllinien auf eine unterschiedlich starke Dysfunktion der ziliäre Barriere hin, was insbesondere durch deutlich reduzierte Level von Arl13b sichtbar wurde. Auch die auf Proteinebene zu ähnlichen Verkürzungen führenden BBS- und JS-Mutationen in *CEP290* wiesen insbesondere hinsichtlich der ziliären Proteinzusammensetzung deutliche Unterschiede auf. Diese implizieren, dass der IFT in der JS-Modell-Zelllinie aufgrund erhöhter Ift88-Level erheblich stärker gestört sein könnte als in der BBS-Modell-Zelllinie. Dahingegen scheint der CEP290-Interaktionspartner *Pcm-1* zumindest in seiner subzellulären Verteilung weitestgehend unbeeinflusst von den untersuchten Mutationen zu sein. Lediglich in der JS-Modell-Zelllinie konnte eine gleichmäßiger im Zytosol verteilte *Pcm-1*-Verteilung beobachtet werden. Alle mit Ziliopathien assoziierten CEP290-Zelllinien

wiesen außerdem eine Einschränkung der Ziliogenese in Form von verkürzten Zilien auf, was suggeriert, dass Arl13b bei der Regulation der Zilienlänge eine größere Bedeutung als das in den meisten CEP290-Zelllinien scheinbar in unveränderter Weise vorliegende Pcm-1 hat. Insgesamt konnten anhand der eruierten Ergebnisse wichtige Hinweise zu den molekularen Ursachen der immensen Variabilität der Erkrankungsgruppe gewonnen und die essentielle Rolle von CEP290 in der Barrierefunktion der Transitions-Zone verifiziert werden.

5.3. Ausblick

Zum weiteren Erkenntnisgewinn über die Pathogenese und die Rolle der Transitions-Zone sowie CEP290 als einer seiner wichtigsten Komponenten bei der Erkrankungsgruppe der Ziliopathien würde sich als nächstes eine weitergehende Charakterisierung der in dieser Arbeit generierten CEP290-Zelllinien anbieten. Hierbei wäre zunächst eine Immunfluoreszenz-basierte Untersuchung weiterer Proteine sinnvoll. So wäre insbesondere die Untersuchung weiterer Komponenten der Transitions-Zone wie zum Beispiel RPGRIP1L und TMEM67 von Interesse, um die Integrität der Transitions-Zone in den mutierten CEP290-Zelllinien noch genauer beurteilen zu können. Für RPGRIP1L wurde in dieser Arbeit bereits ein Antikörper in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie getestet, der sich unter den gewählten Bedingungen allerdings als ungeeignet erwies. Zudem wäre auch die Analyse anderer Komponenten des IFT relevant, um die postulierten Störungen des IFT zu belegen und noch detaillierter aufzuschlüsseln. Ebenso könnte die Untersuchung anderer an der Ziliogenese beteiligter Faktoren aufschlussreich sein, um möglicherweise weitere durch die Mutationen bedingte pathogene Signalwege aufzudecken. Daneben würde auch die direkte Untersuchung der Hedgehog-, Wnt- und Notch-Signalwege dazu beitragen, die Pathogenese-Mechanismen der vielfach bei Ziliopathien beobachteten Zystenbildung genauer zu verstehen [85].

Ferner stellt die Generierung weiterer CEP290-Zelllinien auf Basis der IMCD3-Zelllinie oder aber einer humanen Zelllinie wie der RPE-Zelllinie [21] eine Option dar. In diesem Kontext wäre die Mutagenese von weiteren mit Ziliopathien assoziierten Mutationen in *CEP290* denkbar, wobei einerseits eine Selektion von Mutationen sinnvoll wäre, welche die gleichen Ziliopathien wie in dieser Arbeit untersucht auslösen. Somit könnten die Erkenntnisse dieser Dissertation direkt als Beispiele herangezogen werden. Anschließend könnte dann gezielt nach gemeinsamen Phänotypen gesucht werden, die eine bestimmte Ziliopathie charakterisieren. Andererseits könnte die Analyse von Mutationen, die andere mit CEP290-assoziierte Ziliopathien verursachen aber ebenfalls aufschlussreich sein, um prinzipielle Mechanismen bei deren Pathogenese aufzudecken.

6. Anhang

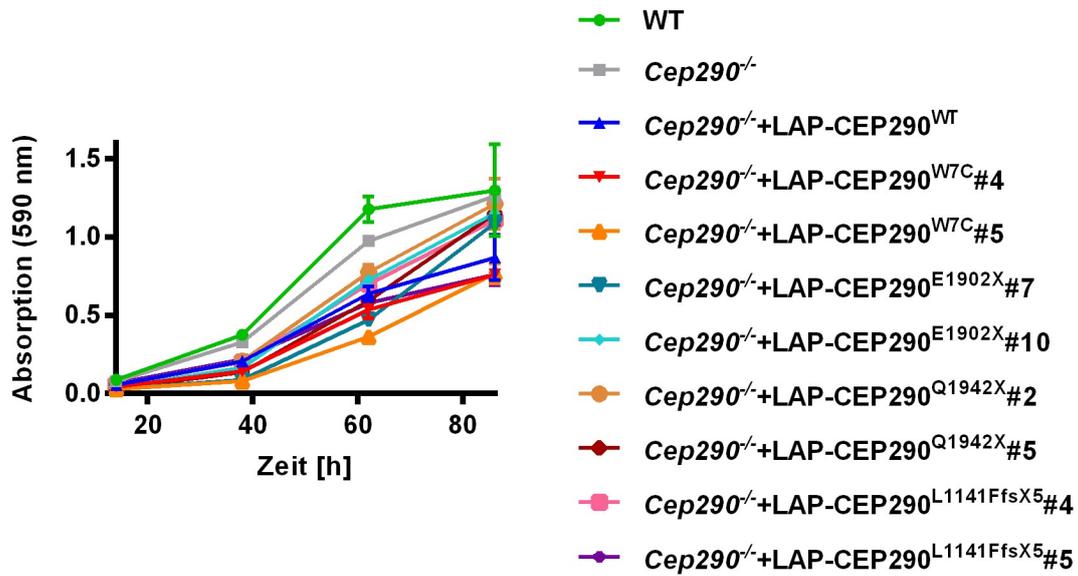


Abbildung 26: Wachstumskurven aller generierten CEP290-Zelllinien im Vergleich zur WT- und *Cep290*^{-/-}-IMCD3-Zelllinie. Die Messung nach Kristallviolett-färbung der Zellen und Reextraktion des Farbstoffes erfolgte nach 14, 38, 62 und 86 Stunden Inkubation jeweils im technischen Triplikate bei einer Absorption von 590 nm. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Arnemann J (2019) DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. Springer, Berlin Heidelberg
2. Arnemann J (2019) Taqman-Sonden. Springer, Berlin Heidelberg
3. Avasthi P, Marshall WF (2012) Stages of Ciliogenesis and Regulation of Ciliary Length. *Differentiation* 83:S30–S42
4. Baala L, Audollent S, Martinovic J, Ozilou C, Babron M-C, Sivanandamoorthy S, Saunier S, Salomon R, Gonzales M, Rattenberry E, Esculpavit C, Toutain A, Moraine C, Parent P, Marcorelles P, Dauge M-C, Roume J, Merrer ML, Meiner V, Meir K, Menez F, Beaufrère A-M, Francannet C, Tantau J, Sinico M, Dumez Y, MacDonald F, Munnich A, Lyonnet S, Gubler M-C, Génin E, Johnson CA, Vekemans M, Encha-Razavi F, Attié-Bitach T (2007) Pleiotropic Effects of CEP290 (NPHP6) Mutations Extend to Meckel Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 81:170–179
5. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:125–148
6. Beckers A, Alten L, Viebahn C, Andre P, Gossler A (2007) The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left–right patterning. *PNAS* 104:15765–15770
7. Betleja E, Cole DG (2010) Ciliary trafficking: CEP290 guards a gated community. *Curr Biol* 20:R928-931
8. Bettencourt-Dias M, Glover DM (2007) Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:451–463
9. Bossis I, Stratakis CA (2004) Minireview: PRKAR1A: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* 145:5452–5458
10. Boxberger HJ (2006) Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken: Einführung in Grundlagen und Techniken. 1. Edition. Wiley-Blackwell, Weinheim
11. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
12. Braun DA, Hildebrandt F (2017) Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9
13. Cantagrel V, Silhavy JL, Bielas SL, Swistun D, Marsh SE, Bertrand JY, Audollent S, Attié-Bitach T, Holden KR, Dobyns WB, Traver D, Al-Gazali L, Ali BR, Lindner TH, Caspary T, Otto EA, Hildebrandt F, Glass IA, Logan CV, Johnson CA, Bennett C, Brancati F, International Joubert Syndrome Related Disorders Study Group, Valente EM, Woods CG, Gleeson JG (2008) Mutations in the cilia gene *ARL13B* lead to the classical form of Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* 83:170–179
14. Chan KM, Zhang H, Malureanu L, Deursen J van, Zhang Z (2011) Diverse factors are involved in maintaining X chromosome inactivation. *PNAS* 108:16699–16704

15. Chang AHK, Jeong J, Levine RL (2011) Iron Regulatory Protein 2 Turnover through a Nonproteasomal Pathway. *J Biol Chem* 286:23698–23707
16. Chavrier P, Vingron M, Sander C, Simons K, Zerial M (1990) Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Molecular and Cellular Biology* 10:6578–6585
17. Coppieters F, Lefever S, Leroy BP, Baere ED (2010) CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Human Mutation* 31:1097–1108
18. Craige B, Tsao C-C, Diener DR, Hou Y, Lechtreck K-F, Rosenbaum JL, Witman GB (2010) CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J Cell Biol* 190:927–940
19. Dammermann A, Merdes A (2002) Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *The Journal of Cell Biology* 159:255–266
20. Dammermann A, Müller-Reichert T, Pelletier L, Habermann B, Desai A, Oegema K (2004) Centriole Assembly Requires Both Centriolar and Pericentriolar Material Proteins. *Developmental Cell* 7:815–829
21. Davis AA, Bernstein PS, Bok D, Turner J, Nachtigal M, Hunt RC (1995) A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:955–964
22. Dawe HR, Smith UM, Cullinane AR, Gerrelli D, Cox P, Badano JL, Blair-Reid S, Sriram N, Katsanis N, Attie-Bitach T, Afford SC, Copp AJ, Kelly DA, Gull K, Johnson CA (2007) The Meckel–Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet* 16:173–186
23. Delous M, Baala L, Salomon R, Laclef C, Vierkotten J, Tory K, Golzio C, Lacoste T, Besse L, Ozilou C, Moutkine I, Hellman NE, Anselme I, Silbermann F, Vesque C, Gerhardt C, Rattenberry E, Wolf MTF, Gubler MC, Martinovic J, Encha-Razavi F, Boddaert N, Gonzales M, Macher MA, Nivet H, Champion G, Berthéléme JP, Niaudet P, McDonald F, Hildebrandt F, Johnson CA, Vekemans M, Antignac C, Rütger U, Schneider-Maunoury S, Attié-Bitach T, Saunier S (2007) The ciliary gene *RPGRIP1L* is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nature Genetics* 39:875–881
24. den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KEJ, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FPM (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet* 79:556–561
25. Dobell C, Leeuwenhoek A van (1932) Antony van Leeuwenhoek and his „Little animals“; being some account of the father of protozoology and bacteriology and his multifarious discoveries in these disciplines; New York, Harcourt, Brace and company
26. Drivas TG, Wojno AP, Tucker BA, Stone EM, Bennett J (2015) Basal exon skipping and genetic pleiotropy: A predictive model of disease pathogenesis. *Sci Transl Med* 7:291ra97
27. Edelheit O, Hanukoglu A, Hanukoglu I (2009) Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* 9:61

28. Fliegauf M, Benzing T, Omran H (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:880–893
29. Follit JA, Tuft RA, Fogarty KE, Pazour GJ (2006) The Intraflagellar Transport Protein IFT20 Is Associated with the Golgi Complex and Is Required for Cilia Assembly. *MBoC* 17:3781–3792
30. Follit JA, Xu F, Keady BT, Pazour GJ (2009) Characterization of mouse IFT complex B. *Cell Motility* 66:457–468
31. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* 31:822–826
32. Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF (2017) Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:a028134
33. Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N (2009) The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell* 137:32–45
34. Gonçalves J, Pelletier L (2017) The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. *Molecules and Cells* 40:243–253
35. Gorden NT, Arts HH, Parisi MA, Coene KLM, Letteboer SJF, van Beersum SEC, Mans DA, Hikida A, Eckert M, Knutzen D, Alswaid AF, Özyurek H, Dibooglu S, Otto EA, Liu Y, Davis EE, Hutter CM, Bammler TK, Farin FM, Dorschner M, Topçu M, Zackai EH, Rosenthal P, Owens KN, Katsanis N, Vincent JB, Hildebrandt F, Rubel EW, Raible DW, Knoers NVAM, Chance PF, Roepman R, Moens CB, Glass IA, Doherty D (2008) CC2D2A Is Mutated in Joubert Syndrome and Interacts with the Ciliopathy-Associated Basal Body Protein CEP290. *The American Journal of Human Genetics* 83:559–571
36. Guo N, Peng Z (2013) MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 9:6–11
37. Helou J, Otto EA, Attanasio M, Allen SJ, Parisi MA, Glass I, Utsch B, Hashmi S, Fazzi E, Omran H, O'Toole JF, Sayer JA, Hildebrandt F (2007) Mutation analysis of NPHP6/CEP290 in patients with Joubert syndrome and Senior-Løken syndrome. *J Med Genet* 44:657–663
38. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026–1030
39. Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 37:120–126
40. Hua K, Ferland RJ (2018) Primary cilia proteins: ciliary and extraciliary sites and functions. *Cell Mol Life Sci* 75:1521–1540
41. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28
42. IzuMi M, Miyazawa H, Kamakura T, Yamaguchi I, Endo T, Hanaoka F (1991) Blasticidin S-resistance gene (bsr): A novel selectable marker for mammalian cells. *Experimental Cell Research* 197:229–233

43. Jacobsen LB, Calvin SA, Colvin KE, Wright M (2004) FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 33:104–112
44. Johnson CM (2013) Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 531:100–109
45. Kagan K, Dufke A, Gembruch U (2017) Renal cystic disease and associated ciliopathies. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 29:85–94
46. Kim J, Krishnaswami SR, Gleeson JG (2008) CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Hum Mol Genet* 17:3796–3805
47. Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Venner K, Ansley SJ, Ross AJ, Leroux MR, Katsanis N, Beales PL (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36:462–470
48. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
49. Leitch CC, Zaghloul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, Alfarhel M, Lewis RA, Eyaid W, Banin E, Dollfus H, Beales PL, Badano JL, Katsanis N (2008) Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nature Genetics* 40:443–448
50. L'Hernault SW, Rosenbaum JL (1985) Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24:473–478
51. Li C, Jensen VL, Park K, Kennedy J, Garcia-Gonzalo FR, Romani M, Mori RD, Bruel A-L, Gaillard D, Doray B, Lopez E, Rivière J-B, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Reiter JF, Blacque OE, Valente EM, Leroux MR (2016) MKS5 and CEP290 Dependent Assembly Pathway of the Ciliary Transition Zone. *PLOS Biology* 14:e1002416
52. Li F-Q, Chen X, Fisher C, Siller SS, Zelikman K, Kuriyama R, Takemaru K-I (2016) BAR Domain-Containing FAM92 Proteins Interact with Chibby1 To Facilitate Ciliogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 36:2668–2680
53. Liew GM, Ye F, Nager AR, Murphy JP, Lee JS, Aguiar M, Breslow DK, Gygi SP, Nachury MV (2014) The Intraflagellar Transport Protein IFT27 Promotes BBSome Exit from Cilia through the GTPase ARL6/BBS3. *Developmental Cell* 31:265–278
54. Mahjoub MR, Tsou M-FB (2013) The Amazing Roles of Centriolar Satellites during Development. *PLOS Genetics* 9:e1004070
55. Mayanagi T, Morita T, Hayashi K, Fukumoto K, Sobue K (2008) Glucocorticoid Receptor-mediated Expression of Caldesmon Regulates Cell Migration via the Reorganization of the Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem* 283:31183–31196
56. Mick DU, Rodrigues RB, Leib RD, Adams CM, Chien AS, Gygi SP, Nachury MV (2015) Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Developmental Cell* 35:497–512
57. Mitchison HM, Valente EM (2017) Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *The Journal of Pathology* 241:294–309

58. Moradi P, Davies WL, Mackay DS, Cheetham ME, Moore AT (2011) Focus on Molecules: Centrosomal protein 290 (CEP290). *Experimental Eye Research* 92:316–317
59. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263–273
60. Nachury MV, Mick DU (2019) Establishing and regulating the composition of cilia for signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1
61. Nag C, Ghosh M, Das K, Ghosh T (2013) Joubert Syndrome: The Molar Tooth Sign of the Mid-Brain. *Ann Med Health Sci Res* 3:291–294
62. Noeske K (1966) Die Bindung von Kristallviolett an Desoxyribonukleinsäure. *Histochemie* 7:273–287
63. Nozaki S, Katoh Y, Terada M, Michisaka S, Funabashi T, Takahashi S, Kontani K, Nakayama K (2017) Regulation of ciliary retrograde protein trafficking by the Joubert syndrome proteins ARL13B and INPP5E. *J Cell Sci* 130:563–576
64. Ott C, Lippincott-Schwartz J (2012) Visualization of live primary cilia dynamics using fluorescence microscopy. *Curr Protoc Cell Biol* 0 4:Unit-4.26
65. Otto EA, Loeys B, Khanna H, Hellemans J, Sudbrak R, Fan S, Muerb U, O'Toole JF, Helou J, Attanasio M, Utsch B, Sayer JA, Lillo C, Jimeno D, Coucke P, Paepe AD, Reinhardt R, Klages S, Tsuda M, Kawakami I, Kusakabe T, Omran H, Imm A, Tippens M, Raymond PA, Hill J, Beales P, He S, Kispert A, Margolis B, Williams DS, Swaroop A, Hildebrandt F (2005) Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat Genet* 37:282–288
66. Pittenger RC, Wolfe RN, Hoehn MM, Marks PN, Daily WA, McGUIRE JM (1953) Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiot Chemother (Northfield)* 3:1268–1278
67. Portran D, Schaedel L, Xu Z, Théry M, Nachury MV (2017) Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nature Cell Biology* 19:391–398
68. Praetorius HA, Spring KR (2005) A Physiological View of the Primary Cilium. *Annual Review of Physiology* 67:515–529
69. Rachel RA, Li T, Swaroop A (2012) Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins. *Cilia* 1:22
70. Rao RN, Allen NE, Hobbs JN, Alborn WE, Kirst HA, Paschal JW (1983) Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24:689–695
71. Rauchman MI, Nigam SK, Delpire E, Gullans SR (1993) An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 265:F416–F424
72. Reiter JF, Leroux MR (2017) Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18:533–547

73. Revenkova E, Liu Q, Gusella GL, Iomini C (2018) The Joubert syndrome protein ARL13B binds tubulin to maintain uniform distribution of proteins along the ciliary membrane. *J Cell Sci* 131:jcs212324
74. Rosenbaum JL, Witman GB (2002) Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:813–825
75. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467
76. Sattar S, Gleeson JG (2011) The ciliopathies in neuronal development: a clinical approach to investigation of Joubert syndrome and Joubert syndrome-related disorders. *Dev Med Child Neurol* 53:793–798
77. Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, Nurnberg G, Kennedy MA, Becker C, Hennies HC, Helou J, Attanasio M, Fausett BV, Utsch B, Khanna H, Liu Y, Drummond I, Kawakami I, Kusakabe T, Tsuda M, Ma L, Lee H, Larson RG, Allen SJ, Wilkinson CJ, Nigg EA, Shou C, Lillo C, Williams DS, Hoppe B, Kemper MJ, Neuhaus T, Parisi MA, Glass IA, Petry M, Kispert A, Gloy J, Ganner A, Walz G, Zhu X, Goldman D, Nurnberg P, Swaroop A, Leroux MR, Hildebrandt F (2006) The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nature Genetics* 38:674–681
78. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
79. Shimada H, Lu Q, Insinna-Kettenhofen C, Nagashima K, English MA, Semler EM, Mahgerefteh J, Cideciyan AV, Li T, Brooks BP, Gunay-Aygun M, Jacobson SG, Cogliati T, Westlake CJ, Swaroop A (2017) In Vitro Modeling Using Ciliopathy-Patient-Derived Cells Reveals Distinct Cilia Dysfunctions Caused by CEP290 Mutations. *Cell Reports* 20:384–396
80. Steward MW, Lew AM (1985) The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *Journal of Immunological Methods* 78:173–190
81. Szymanska K, Johnson CA (2012) The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia* 1:10
82. Thumann G, Stöcker M, Maltusch C, Salz AK, Barth S, Walter P, Johnen S (2010) High efficiency non-viral transfection of retinal and iris pigment epithelial cells with pigment epithelium-derived factor. *Gene Therapy* 17:181–189
83. Tony Yang T, Su J, Wang W-J, Craige B, Witman GB, Bryan Tsou M-F, Liao J-C (2015) Superresolution Pattern Recognition Reveals the Architectural Map of the Ciliary Transition Zone. *Scientific Reports* 5:14096
84. Torres JZ, Miller JJ, Jackson PK (2009) High throughput generation of tagged stable cell lines for proteomic analysis. *Proteomics* 9:2888–2891
85. Tran PV, Sharma M, Li X, Calvet JP (2014) Developmental Signaling: Does It Bridge the Gap Between Cilia Dysfunction and Renal Cystogenesis? *Birth Defects Res C Embryo Today* 102:159–173

86. Tsang WY, Bossard C, Khanna H, Peränen J, Swaroop A, Malhotra V, Dynlacht BD (2008) CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. *Dev Cell* 15:187–197
87. Tuson M, He M, Anderson KV (2011) Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development* 138:4921–4930
88. Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, Barrano G, Krishnaswami SR, Castori M, Lancaster MA, Boltshauser E, Boccone L, Al-Gazali L, Fazzi E, Signorini S, Louie CM, Bellacchio E, Related Disorders Study Group IJS, Bertini E, Dallapiccola B, Gleeson JG (2006) Mutations in *CEP290*, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nature Genetics* 38:623–625
89. Veland IR, Awan A, Pedersen LB, Yoder BK, Christensen ST (2009) Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol* 111:p39–p53
90. Verhey KJ, Dishinger J, Kee HL (2011) Kinesin Motors and Primary Cilia. *Biochem Soc Trans* 39:1120–1125
91. Waters AM, Beales PL (2011) Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr Nephrol* 26:1039–1056
92. Woodruff JB, Wueseke O, Hyman AA (2014) Pericentriolar material structure and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369:20130459
93. Yamaguchi K, Inoue S, Ohara O, Nagase T (2009) Pulse-Chase Experiment for the Analysis of Protein Stability in Cultured Mammalian Cells by Covalent Fluorescent Labeling of Fusion Proteins. In: Koga H. (eds) *Reverse Chemical Genetics. Methods in Molecular Biology™ (Methods and Protocols)*, vol 577. Humana Press, Totowa, NJ
94. Yang H, Chen D, Cui QC, Yuan X, Dou QP (2006) Celastrol, a Triterpene Extracted from the Chinese “Thunder of God Vine,” Is a Potent Proteasome Inhibitor and Suppresses Human Prostate Cancer Growth in Nude Mice. *Cancer Res* 66:4758–4765
95. Yang TT, Tran MNT, Chong WM, Huang C-E, Liao J-C (2019) Single-particle tracking localization microscopy reveals nonaxonemal dynamics of intraflagellar transport proteins at the base of mammalian primary cilia. *MBoC* 30:828–837
96. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, Shen Y, Pervouchine DD, Djebali S, Thurman RE, Kaul R, Rynes E, Kirilusha A, Marinov GK, Williams BA, Trout D, Amrhein H, Fisher-Aylor K, Antoshechkin I, DeSalvo G, See L-H, Fastuca M, Drenkow J, Zaleski C, Dobin A, Prieto P, Lagarde J, Bussotti G, Tanzer A, Denas O, Li K, Bender MA, Zhang M, Byron R, Groudine MT, McCleary D, Pham L, Ye Z, Kuan S, Edsall L, Wu Y-C, Rasmussen MD, Bansal MS, Kellis M, Keller CA, Morrissey CS, Mishra T, Jain D, Dogan N, Harris RS, Cayting P, Kawli T, Boyle AP, Euskirchen G, Kundaje A, Lin S, Lin Y, Jansen C, Malladi VS, Cline MS, Erickson DT, Kirkup VM, Learned K, Sloan CA, Rosenbloom KR, Sousa BL de, Beal K, Pignatelli M, Flicek P, Lian J, Kahveci T, Lee D, Kent WJ, Santos MR, Herrero J, Notredame C, Johnson A, Vong S, Lee K, Bates D, Neri F, Diegel M, Canfield T, Sabo PJ, Wilken MS, Reh TA, Giste E, Shafer A, Kuttyavin T, Haugen E, Dunn D, Reynolds AP, Neph S, Humbert R, Hansen RS, Bruijn MD, Selleri L, Rudensky A, Josefowicz S, Samstein R, Eichler EE, Orkin SH, Levasseur D, Papayannopoulou T, Chang K-H, Skoultschi A, Gosh S, Disteche C, Treuting P, Wang Y, Weiss MJ, Blobel

- GA, Cao X, Zhong S, Wang T, Good PJ, Lowdon RF, Adams LB, Zhou X-Q, Pazin MJ, Feingold EA, Wold B, Taylor J, Mortazavi A, Weissman SM, Stamatoyannopoulos JA, Snyder MP, Guigo R, Gingeras TR, Gilbert DM, Hardison RC, Beer MA, Ren B, Consortium TME (2014) A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *nature* 515:355–364
97. Zhang Y, Seo S, Bhattarai S, Bugge K, Searby CC, Zhang Q, Drack AV, Stone EM, Sheffield VC (2014) BBS mutations modify phenotypic expression of CEP290-related ciliopathies. *Hum Mol Genet* 23:40–51
98. Zimmermann K (1898) Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. *Archiv f. mikrosk. Anat.* 52, 552–706

8. Danksagung

Zu aller erst möchte ich einen außerordentlichen Dank an Herrn Jun.-Prof. Dr. David Mick richten, der mir als Doktorvater ermöglichte an einem spannenden Forschungsthema in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten. Besonders möchte ich mich bei ihm für die hervorragende Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und die motivierenden Worte bedanken.

Innerhalb der Arbeitsgruppe möchte ich mich vor allem bei Elena May bedanken, die mir bei der Einarbeitung, insbesondere in die Zellkultur, wesentlich geholfen hat und zudem immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Daneben gilt mein Dank auch Tommy Sroka, der mich vor allen Dingen bei der Arbeit mit der Software „Fiji“ unterstützt hat. Nicole Heim danke ich für die strukturierte Durchführung eines Teils der Immunfluoreszenzen in dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich insbesondere bei Florian Wollweber bedanken, der stets am Fortschritt der Arbeit interessiert war und mir über die gesamte Zeit beratend zur Seite stand. Durch die gemeinsame Erarbeitung von experimentellen Strategien hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. Alexander von der Malsburg für seine ausgesprochene Hilfsbereitschaft und wertvolle Diskussionen.

Meinem Bruder und Mitstreiter Fabian Riske möchte ich ebenso für hilfreiche Diskussionen und die Erarbeitung von Problemlösungen danken.

Für das zur Verfügung stellen der *Pcm-1^{-/-}*-Zelllinie und des anti-PCM-1 Antikörpers möchte ich mich bei Elif Nur Firat-Karalar, Ph.D. bedanken.

Bei Carsten Mattes und Gertrud Schwär bedanke ich mich für die konstruktiven Gespräche zur Planung des qPCR-Ansatzes sowie die unkomplizierte Bereitstellung von Primerpaaren.

Ferner danke ich auch allen nicht genannten Mitarbeitern der AG Mick und AG van der Laan für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die allzeitige Hilfsbereitschaft.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, Carla und Helmut Riske, sowie Großeltern, Karin und Eugen Fischer, die mir in allen Lebenslagen immer unterstützend und motivierend zur Seite gestanden haben. Auf sie kann ich mich jederzeit verlassen, wofür ich mich herzlich bedanken möchte. Ihnen verdanke ich auch die Ermöglichung des Studiums der Humanmedizin als einen Grundstein für meinen weiteren Lebensweg.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.