

Molekulare Pathogenese des Joubert-Syndroms

- Die Rolle des Proteins KIF7 -

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Claudia Dafinger

aus Dachau

Köln 2014

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Peter Nürnberg
Prof. Dr. Bernd Wollnik

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 08.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 SUMMARY	2
3 EINLEITUNG.....	3
3.1 Joubert-Syndrom (JBTS).....	3
3.1.1 Symptomatik des Joubert-Syndroms.....	3
3.1.2 Molekulare Grundlagen und Pathophysiologie des Joubert-Syndroms	4
3.2 Die Rolle von Zilien bei der Pathogenese des Joubert-Syndroms.....	6
3.2.1 Aufbau und Struktur von Zilien	6
3.2.2 Funktion von Zilien.....	7
3.2.3 Ziliäre Hypothese.....	8
3.3 Ziliopathien	9
3.4 Das Mikrotubulus-Zytoskelett.....	10
3.4.1 Aufbau und posttranslationale Modifikationen von Mikrotubuli.....	10
3.4.2 Kinesine und der Transport entlang von Mikrotubuli	12
3.4.3 Die Rolle von Kinesinen in primären Zilien	13
4 MATERIAL UND METHODEN.....	15
4.1 Material	15
4.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	15
4.1.2 Verbrauchsmaterial	18
4.1.3 Geräte.....	19
4.1.4 Puffer und Lösungen.....	21
4.1.5 Kits.....	24
4.1.6 Antikörper	25
4.1.7 Plasmide.....	26
4.1.8 Oligonukleotide/Primer.....	26

4.1.8.1	Genotypisierungsprimer.....	27
4.1.8.2	Klonierungsprimer.....	31
4.1.8.3	Sequenzierungsprimer.....	33
4.1.8.4	siRNA Oligonukleotide.....	35
4.1.8.5	qRT-PCR Primer.....	35
4.1.9	Software.....	36
4.2	Methoden.....	37
4.2.1	Isolierung von DNA aus Vollblut.....	37
4.2.2	Isolierung von DNA aus Wangenschleimhaut.....	38
4.2.3	Isolierung von RNA aus Zellen.....	38
4.2.4	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen.....	38
4.2.5	Genomweite Kopplungsanalyse.....	39
4.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction).....	40
4.2.7	Agarosegelelektrophorese.....	41
4.2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	41
4.2.8.1	Enzymatische Aufreinigung.....	41
4.2.8.2	Säulenaufreinigung.....	42
4.2.9	Sequenzierung.....	42
4.2.10	Genotypisierung von Patienten und Kontrollen.....	43
4.2.11	Analyse von Haplotypen.....	45
4.2.12	Expressionsanalyse.....	45
4.2.13	Klonierung.....	46
4.2.13.1	Primerdesign und Amplifikation.....	46
4.2.13.2	Restriktionsverdau.....	47
4.2.13.3	Gelextraktion.....	48
4.2.13.4	Ligation.....	48
4.2.13.5	Transformation.....	48
4.2.13.6	Bakterienkultur.....	49
4.2.13.6.1	Plasmidminipräparation.....	49
4.2.13.6.2	Plasmidmidi-/maxi-präparation.....	49
4.2.13.7	LR-Rekombination (Gateway® Klonierung).....	49
4.2.14	siRNA Annealing.....	50
4.2.15	Zellkultur.....	50
4.2.15.1	Lagerung und Kultivierung von Säugetierzellen.....	50
4.2.15.2	Transfektion von Säugetierzellen.....	52
4.2.15.3	Transfektion mittels Kalziumphosphat-Präzipitation.....	52
4.2.15.4	Transfektion mittels Lipofektion.....	52
4.2.15.5	Transfektion mittels komplexen Transfektionsreagenzien.....	53
4.2.16	Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen.....	53
4.2.17	Co-Immunoprecipitation (Co-IP) von Proteinen.....	54

4.2.18	Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	54
4.2.19	Westernblot (WB).....	55
4.2.20	Immunfärbung von WB.....	55
4.2.21	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	56
4.2.22	Elektronenmikroskopie.....	56
4.2.23	VSV-G Assay.....	57
4.2.24	Migrationsassay.....	57
4.2.25	Durchflusszytometrie Analyse.....	57
4.2.26	Reverse Transkription.....	58
4.2.27	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR).....	59
4.2.28	Luciferase Assay.....	60
5	ERGEBNISSE.....	62
5.1	Identifikation von Mutationen in KIF7 in JBTS Patienten.....	62
5.2	Lokalisation von KIF7.....	73
5.3	Validierung einer siRNA zur negativen Regulation der KIF7 Expression.....	77
5.4	KIF7 interagiert mit dem JBTS4 Protein NPHP1.....	79
5.5	Knockdown von KIF7 in Zellkultur führt zu Struktur-veränderungen in verschiedenen Zellorganellen.....	81
5.5.1	Fragmentierung des Golgi Apparates.....	81
5.5.2	Duplikation von Zentrosomen und Reduktion ziliierter Zellen.....	87
5.5.3	KIF7 beeinflusst die Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli.....	88
5.6	KIF7 beeinflusst die Zellpolarität.....	93
5.7	KIF7 hat einen Effekt auf die Migration und den Zellzyklus.....	95
6	DISKUSSION.....	97
6.1	Mutationen in KIF7 verursachen das Joubert-Syndrom.....	97
6.2	KIF7 lokalisiert an primären Zilien und spielt eine Rolle in der Strukturhaltung verschiedener Zellorganellen.....	101
6.2.1	KIF7 lokalisiert an primären Zilien.....	101
6.2.2	KIF7 interagiert mit dem Nephronophthise Protein NPHP1 (JBTS4).....	101
6.2.3	<i>Knockdown</i> von <i>KIF7</i> führt zur Fragmentierung des Golgi Apparats.....	102
6.2.4	<i>Knockdown</i> von <i>KIF7</i> führt zur Reduktion der Anzahl ziliierter Zellen und zur vermehrten Duplikation von Zentrosomen.....	104

6.2.5	KIF7 beeinflusst die Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli und die Polarität der Zelle	104
6.3	KIF7 spielt eine Rolle in der Zellmigration und der Zellteilung	107
6.4	Modell der zellulären Funktionen von KIF7	108
7	LITERATURVERZEICHNIS	110
8	PUBLIKATIONEN	131
8.1	Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	131
8.2	Publikationen in internationalen akademischen Kongressen	132
9	DANKSAGUNGEN	133
10	LEBENS LAUF	134
11	ERKLÄRUNG	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hedgehog (Hh)-Signaltransduktionswegs in primären Zilien.....	8
Abbildung 2: Aufbau von Mikrotubuli und posttranskriptionale Modifikationen (PTMs).	11
Abbildung 3: Stammbaum und klinische Symptomatik der betroffenen ägyptischen Familie.	63
Abbildung 4: Haplotypanalyse der ägyptischen Familie und Segregation des Lokus 15q25.3-26.3.....	65
Abbildung 5: Kandidatengene auf dem Lokus 15q25.3-26.3 (rote Box oben).....	66
Abbildung 6: Mutation in <i>KIF7</i> und Allelverteilung innerhalb der Familie.....	68
Abbildung 7: Screening nach weiteren JBTS Patienten mit <i>KIF7</i> Mutationen.	70
Abbildung 8: Ausschluss von Exondeletionen in den Patienten G1 und G2.....	71
Abbildung 9: Expressionsprofil von humanem und murinem <i>KIF7</i>	72
Abbildung 10: Etablierung der Flp-In Methode und Nachweis der Expression von <i>KIF7</i> -GFP.	74
Abbildung 11: <i>KIF7</i> lokalisiert am Zentrosom in nicht-zilierten Zellen.	75
Abbildung 12: In zilierten Zellen lokalisiert <i>KIF7</i> am Zentrosom und an der Spitze des Ziliums.	75
Abbildung 13: <i>KIF7</i> zeigt unterschiedliche Lokalisationen innerhalb des Ziliums.....	76
Abbildung 14: Validierung der <i>KIF7</i> siRNAs in HEK293T, RPE-1 und U2OS Zellen.....	78
Abbildung 15: <i>KIF7</i> interagiert mit dem bekannten JBTS Protein NPHP1.	80
Abbildung 16: Der <i>knockdown</i> von <i>KIF7</i> verursacht eine Fragmentierung des Golgi Apparats.	82
Abbildung 17: Der <i>knockdown</i> von <i>KIF7</i> beeinträchtigt alle drei Kompartimente des Golgi Apparats.	83
Abbildung 18: Überexpression von <i>KIF7</i> FL verhindert den <i>KIF7 knockdown</i> Effekt auf den Golgi Apparat in RPE-1 Zellen.	85
Abbildung 19: Der <i>knockdown</i> von <i>KIF7</i> führt nicht zu einem sekretorischen Funktionsverlust des Golgi Apparats in RPE-1 Zellen.	86
Abbildung 20: Der <i>knockdown</i> von <i>KIF7</i> führt zu vermehrter Zentrosomenduplikation und weniger zilierten Zellen.....	87
Abbildung 21: <i>KIF7 knockdown</i> und Überexpression der <i>KIF7</i> ⁵¹³⁻¹³⁴³ Trunkation stabilisieren Mikrotubuli.....	89

Abbildung 22: KIF7 co-präzipitiert mit der Histondeacetylase 6 (HDAC6) und reguliert dessen Effekt auf die Tubulinacetylierung.....	90
Abbildung 23: KIF7 beeinflusst die Dynamik von Mikrotubuli.....	92
Abbildung 24: KIF7 co-präzipitiert mit PAR3 und beeinflusst die Zellpolarität.	94
Abbildung 25: Im Migrationsassay zeigen <i>KIF7 knockdown</i> Zellen eine reduzierte Migrationsfähigkeit.	95
Abbildung 26: Der <i>knockdown</i> von <i>KIF7</i> in U2OS Zellen verursacht eine Verschiebung des Zellzyklus Richtung G ₂ /M.	96
Abbildung 27: <i>KIF7</i> Genstruktur und schematische Darstellung von KIF7.....	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die bisher bekannten JBTS Gene.	4
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lösungen mit Angabe von Artikelnummer und Hersteller.	15
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien mit Angabe von Artikelnummer und Hersteller.	18
Tabelle 4: Verwendete Geräte mit Angabe von Modell und Hersteller.	19
Tabelle 5: Puffer und Lösungen mit Angabe der jeweiligen Zusammensetzung.	21
Tabelle 6: Verwendete Assays und Kits mit Angabe von Artikelnummer und Hersteller.	24
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper mit Angabe von Antigen, Klon, Wirt, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.	25
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Antigen, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.	25
Tabelle 9: Verwendete Plasmide und deren Herkunft.	26
Tabelle 10: Genotypisierungsprimer und PCR-Bedingungen für das Gen <i>TTC23</i>	27
Tabelle 11: Genotypisierungsprimer und PCR-Bedingungen für das Gen <i>NTRK3</i>	28
Tabelle 12: Genotypisierungsprimer und PCR-Bedingungen für das Gen <i>RLBP1</i>	29
Tabelle 13: Genotypisierungsprimer und PCR-Bedingungen für das Gen <i>KIF7</i>	29
Tabelle 14: Verwendete Klonierungsprimer mit Sequenz in 5'→3' Richtung, Fragmentgröße und Template.	31
Tabelle 15: Verwendete Sequenzierungsprimer, mit Angabe von Sequenz in 5'→3' Richtung und Richtungsangabe.	33
Tabelle 16: Verwendete siRNA Oligonukleotide mit Angabe von Sequenz in 5'→3' Richtung und Hersteller.	35
Tabelle 17: Verwendete qRT-PCR Primer mit Angabe von Sequenz in 5'→3' Richtung und Fragmentgröße.	35
Tabelle 18: Verwendete Computerprogramme zur Darstellung und Auswertung der Daten. .	36
Tabelle 19: Verwendete online-verfügbare Datenbanken.	37
Tabelle 20: Verwendete DNA Polymerasen mit Angabe der Syntheserate, der maximalen Leistung, der Anwendung innerhalb dieser Arbeit, der Artikelnummer und des Herstellers. .	41
Tabelle 21: Bekannte <i>single nucleotide polymorphisms</i> (SNPs) im Gen <i>KIF7</i>	44
Tabelle 22: Verwendete Restriktionsenzyme mit Angabe der optimalen Reaktionsbedingungen, der Artikelnummer und dem Hersteller.	47

Tabelle 23: Verwendete Zelllinien, deren Ursprung, das entsprechende Medium und dessen Herkunft.	51
Tabelle 24: Verwendete Maximale DNA-Menge und die CaCl ₂ und 2x HEBS Volumina bezogen auf die Größe der Zellkulturschale.	52
Tabelle 25: Verwendete Lipofektionsreagenzien mit Angabe der Zelllinie und dem Verwendungszweck.	53

Abkürzungsverzeichnis

+TIP	<i>Microtubule plus end tracking proteins</i>
α TAT1	α -Tubulin N-Acetyltransferase
A	Adenin
A	Alanin
ACLS	Acrocallosal-Syndrom
ADP	Adenindiphosphat
ADPKD	<i>Autosomal-dominant polycystic kidney disease</i> (autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung)
AHI	<i>Abelson helper integration site</i>
AK	Alzheimer-Krankheit
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APKC	<i>Atypical protein kinase C</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	<i>Arrest-defective</i>
ARL	<i>ADP-ribosylation factor-like</i>
ARPKD	<i>Autosomal-recessive polycystic kidney disease</i> (autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung)
ATP	Adenosintriphosphat
BBIP	BBSome interagierendes Protein
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
C5orf42	<i>Chromosome 5 open reading frame 42</i>
CC	Coiled-coil
CC2D	Coiled-coil and C2 domain containing
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CEP	<i>Centrosomal protein</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CLASP	<i>Cytoplasmic linker-associated protein</i>
CNV	<i>Copy number variations</i> (Variationen in der Kopienzahl)
co	<i>Control</i> (Kontrolle)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

COACH	<i>Cerebellar vermis hypo/aplasia, oligophrenia, congenital ataxia, ocular coloboma, and hepatic fibrosis</i> (Joubert-Syndrom mit Kolobom und kongenitaler Leberfibrose)
CORS	<i>Cerebello-oculo-renal syndrome</i>
CTS	<i>Ciliary targeting sequence</i> (ziliäres Lokalisationssignal)
D	Asparaginsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	Didestilliertes Wasser
DIC	<i>differential interference contrast</i> (Differentialinterferenzkontrast)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant-negativ
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)
DNase	Deoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ddNTP	Dideoxy-Nukleotid-Triphosphat
Dhh	Desert Hedgehog
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ELP	Elongator-Protein-Komplex
EPS	<i>Epidermal growth factor receptor pathway substrate</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ε	Extinktionsfaktor
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
FL	<i>Full length</i> (Volllänge)
Flp	Flippase
FRT	<i>Flp-recombinase target</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Gravitation
G	Guanin
G	Glycin
GCN	<i>General control of amino acid synthesis</i>
GFP	<i>Green-fluorescent protein</i> (grün-fluoreszierenden Protein)
GM130	Golgi Matrix Protein 130

GOI	<i>Gene of interest</i> (Gen von Interesse)
GTP	Guanosintriphosphat
h	human (Mensch)
HDAC	Histondeacetylase
HEBS	<i>Hepes-buffered saline</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
Hh	Hedgehog
HK	Huntington-Krankheit
HLS	Hydrolethalus-Syndrom
HPRT	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFT	Intraflagellarer Transport
Ihh	Indian Hedgehog
INPP5	<i>Inositol polyphosphate-5-phosphatase</i>
IP	Immunopräzipitation
JBTS	Joubert-Syndrom
JSRD	<i>Joubert syndrome related disorders</i> (Joubert-Syndrom verwandte Krankheiten)
K	Konzentration
KAP	Kinesin-assoziiertes Protein
KIF	<i>Kinesin family member</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LCA	<i>Leber congenital amaurosis</i> (Lebersche kongenitale Amaurose)
LOD	<i>Logarithmic odds ratio</i>
m	Murin (Maus)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MEC	<i>Mechanosensory abnormality</i>
MKS	Meckel-Gruber-Syndrom
MORM	<i>Mental retardation, truncal obesity, retinal dystrophy, micropenis</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multisystematrophie
MT	Mikrotubuli
MTOC	<i>Microtubuli-Organizing-Center</i>
MTS	<i>Molar tooth sign</i> (Backenzahnzeichen)
N-Terminus	Amino-Terminus

NAT	N-Acetyltransferase
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NPC	Niemann-Pick-Krankheit Typ C
NPH	Nephronophthise
NPHP	Nephronophthise Protein
NTC	<i>Non-template control</i>
NTRK	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor</i>
OD	Optische Dichte
OFD	Orofaciodigital-Syndrom
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PAA	Polyacrylamid
PAR	<i>Partitioning defective</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor aus Thrombozyten)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIM	Protease Inhibitor Mix
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PK	Parkinson-Krankheit
PKD	<i>Polycystic kidney disease</i> (polyzystische Nierenerkrankung)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTCH	Patched
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
r	Aus der Ratte
RLBP	<i>Retinaldehyde binding protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPGRIP1L	<i>Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1-like</i>
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur

SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SCA	<i>Spinocerebellar ataxias</i> (Spinozerebelläre Ataxien)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom
Shh	Sonic Hedgehog
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SIRT	Sirtuin
SLS	Senior-Løken-Syndrom
SMO	Smoothend
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
SUFU	<i>Suppressor of Fused</i>
t	Zeit
T	Tymin
T _m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCTN	<i>Tectonic family member</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMEM	<i>Transmembrane protein</i>
TSA	Trichostatin A
TTC	<i>Tetratricopeptide repeat domain</i>
U	Unit (Einheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
USH	Usher-Syndrom
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
VF	Verdünnungsfaktor
VHL	Von-Hippel-Lindau
VSV-G	Vesicular-Stomatitis-Virus, Glykoprotein G
WB	Westernblot
WCL	<i>Whole cell lysate</i> (Lysat aus der ganzen Zelle)
WT	Wildtyp
XL	<i>Extra large</i>
Y	Tyrosin

1 Zusammenfassung

Das Joubert-Syndrom (JBTS) ist eine seltene meist autosomal-rezessive vererbte Entwicklungsstörung, die durch eine spezifische Gehirnfehlbildung und verschiedene weiteren Pathologien charakterisiert ist. Das JBTS kann durch Mutationen in mehr als 19 unterschiedlichen Genen verursacht werden, die alle an der Bildung oder Funktion von primären Zilien beteiligt sind. Primäre Zilien erfüllen wichtige Aufgaben bei der Entwicklung in Vertebraten. Mutationen, die dieses Organell betreffen, unterliegen einer großen Gruppe von Erkrankungen, die als Ziliopathien bezeichnet werden.

In einer konsanguinen JBTS Familie konnte bei den betroffenen Familienmitgliedern mit Hilfe einer Genkopplungsanalyse eine homozygote 1 bp-Deletion in Exon 1 des Gens *KIF7* identifiziert werden, die mit dem Phänotyp segregiert. Darüber hinaus konnten *KIF7* Mutationen bei weiteren JBTS Patienten nachgewiesen werden. *KIF7* gehört zu der Familie der Kinesin-Motorproteine und ist ein evolutionär konservierter, bekannter Regulator des Sonic Hedgehog Signaltransduktionswegs. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *KIF7* in einem Proteinkomplex mit dem JBTS4 Protein NPHP1 vorliegt. Der *knockdown* von *KIF7* in retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-1) führt zu multiplen Veränderungen in der Zelle, wie einer geringeren Anzahl ziliierter Zellen und einer abnormal erhöhten Zentrosomenzahl. Des Weiteren zeigt sich eine Fragmentierung aller drei Kompartimente des Golgi Apparats, die durch die exogene Expression einer siRNA-insensitiven Form von *KIF7* rückgängig gemacht werden kann. Zudem ist der *knockdown* von *KIF7* mit Veränderungen der Zellform und des gerichteten Wachstums im Zellverband assoziiert. Passend hierzu fand sich *KIF7* in einem Proteinkomplex mit dem Par-Polaritätskomplexprotein PAR3.

Als mögliche Ursache der zellulären Phänotypen konnte bei einer *KIF7*-Dysfunktion eine verstärkte Stabilisierung und Acetylierung des zytoplasmatischen Mikrotubuli-Netzwerks nachgewiesen werden. Diese Veränderungen in der Stabilität der Mikrotubuli könnten als Krankheitsmechanismus zu Grunde liegen, der sowohl die ziliäre Funktion, als auch die Zellpolarität und den Zellzyklus beeinträchtigt.

2 Summary

Joubert syndrome (JBTS) is a rare recessively inherited developmental disorder characterized by a specific brain malformation with various additional pathologies. JBTS results from mutations in at least 19 different genes, all of which play a role in the formation or function of primary cilia. Primary cilia have pivotal roles in vertebrate development, and mutations affecting this organelle underlie a large group of diseases referred to as ciliopathies.

In a consanguineous JBTS family a homozygous 1 bp deletion in exon 1 of the gene in *KIF7* that segregates with the phenotype was identified by positional cloning, and subsequently other *KIF7* mutations in additional patients with JBTS. *KIF7* belongs to the family of kinesin motor proteins and is an evolutionary conserved, known regulator of Sonic Hedgehog signalling. This work shows that *KIF7* is present in a protein complex with the JBTS4 protein NPHP1. Knockdown of *KIF7* in retinal pigment epithelial (RPE-1) cells leads to multiple structural changes in the cell, such as a reduced amount of ciliated cells and an abnormal increased number of centrosomes. *KIF7* knockdown also leads to fragmentation of all three compartments of the Golgi network, which was rescued by expression of a siRNA-insensitive form of *KIF7*. Furthermore, knockdown of *KIF7* is associated with alterations in cell shape and directed growth of the united cell structure. Consistently with this, *KIF7* was found in a protein complex with the Par polarity complex protein PAR3.

An increased stability and acetylation of the cytoplasmic microtubuli network could be causative for the observed cellular phenotypes that were associated with *KIF7* dysfunction. Changes in microtubule stability might comprise underlying disease mechanisms impacting ciliary function, cellular polarity and cell cycle progression.

3 Einleitung

3.1 Joubert-Syndrom (JBTS)

Das Joubert-Syndrom (JBTS) ist eine seltene autosomal oder X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Die Prävalenz wird auf etwa 1:100.000 geschätzt¹. Marie Joubert erkannte 1969 erstmals einen syndromalen Zusammenhang der klassischen Symptome des Joubert-Syndroms². Im Jahr 1977 beschrieb Eugen Boltshauser weitere Fälle, welche das JBTS auch unter dem Namen Joubert-Boltshauser-Syndrom³ bekannt machten.

3.1.1 Symptomatik des Joubert-Syndroms

Die augenscheinlichsten klinischen Merkmale sind ein schwankender Gang und ein gestörtes Gleichgewicht, welche durch das Auftreten von Bewegungskordinationsstörungen (Ataxie), Muskelhypotonie und rhythmisches Muskelzittern (Tremor) entstehen. Weitere klassische Symptome des JBTS sind ein abnormales Atmungsmuster in der Kindheit (Apnoe oder Hyperpnoe), Vorverlagerung (Protrusion) der Zunge, unwillkürliche rhythmische Bewegungen der Augen/Augenzittern (Nystagmus) und die Verzögerung der motorischen und geistigen Entwicklung. Seltener auftretende Symptome sind Veränderungen der Netzhaut im Auge (Retinaldystrophie) und nephronophthise-artig veränderte Nieren (zystische und fibrotische Veränderungen der Nieren). Beide treten in einer Häufigkeit von unter 10% auf.

Des Weiteren ist das Krankheitsbild durch charakteristische kraniofaziale Anomalien (großer Kopf, prominente Stirn, hohe und gerundete Augenbrauen, dreieckiger Mund mit abwärtsgerichteten Mundwinkeln, verbreiterte Nasenbasis, weitstehende Augen, ausgeprägte Epikanthus-Falte, nach unten geneigte Lidspalte) und Polydaktylie geprägt. Das Markenzeichen, welches die Diagnose Joubert-Syndrom sichert, ist das sogenannte „Backenzahnzeichen“ („*molar tooth sign*“, MTS), welches in der axialen Ebene einer Magnetresonanztomographie sichtbar ist^{4,5}. Dieses Merkmal resultiert aus der Abwesenheit (Aplasie) oder Unterentwicklung (Hypoplasie) des Kleinhirnwurms (*Vermis cerebelli*), der die Verbindung zwischen den beiden Hemisphären des Kleinhirns (Zerebellum) darstellt, und Fehlbildungen des Mittel- und Rautenhirns.

3.1.2 Molekulare Grundlagen und Pathophysiologie des Joubert-Syndroms

Das Joubert-Syndrom ist eine genetisch sehr heterogene Erkrankung. Es wurden bisher 19 kausale Gene identifiziert, die mindestens 50% der bekannten Fälle abdecken⁶. Mit Ausnahme von *OFDI*, werden alle bekannten JBTS Gene autosomal rezessiv vererbt. *OFDI* wird X-chromosomal vererbt. Eine Übersicht über die Gene/Proteine, die Phänotypen und die chromosomale Position ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die bisher bekannten JBTS Gene.

*Die Identifizierung von *KIF7* als JBTS Gen ist Teil dieser Arbeit. Cytogenetische Lokalisation und genomische Koordinaten aus der Datenbank OMIM⁷.

Gen	Protein	Phänotyp	Cytogenet. Lokalisation	Genomische Koordinaten	Referenz
<i>INPP5E</i>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase E	JBTS1/MORM/CORS1	9q34.3	139,323,066 - 139,334,255	8
<i>TMEM216</i>	Transmembrane protein 216	JBTS2/MKS2/CORS2	11q12.2	61,159,831 - 61,166,334	9–11
<i>AHII</i>	Jouberin (Abelson helper integration-1)	JBTS3	6q23.3	135,605,109 - 135,818,902	12–14
<i>NPHP1</i>	Nephrocystin-1	JBTS4/NPHP1/SLS1	2q13	110,880,912 - 110,962,638	15,16
<i>CEP290</i>	290-kDa centrosomal protein	JBTS5/MKS4/SLSN6/LCA10/NPHP6/BBS14	12q21.32	88,442,789 - 88,535,992	17,18
<i>TMEM67</i>	Meckelin	JBTS6/MKS3/COACH/NPHP11/(BBS14 modifier)	8q22.1	94,767,071 - 94,831,461	19
<i>RPGRIP1L</i>	Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1-like	JBTS7/MKS5/NPHP8/COACH	16q12.2	53,633,817 - 53,737,770	20,21
<i>ARL13B</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 13B	JBTS8	3q11.2	95,181,672-95,256,813	22
<i>CC2D2A</i>	Coiled-coil and C2 domain containing protein 2A	JBTS9/MKS6/COACH	4p15.32	15,471,488 - 15,603,179	23
<i>OFDI</i>	Oral-facial-digital syndrome 1	JBTS10/OFD1/SGBS2	Xp22.2	13,752,831 - 13,787,479	24,25

Gen	Protein	Phänotyp	Cytogenet. Lokalisation	Genomische Koordinaten	Referenz
<i>TTC21B</i>	Tetratricopeptide repeat domain 21B	JBTS11/NPHP12/ATD 4	2q24.3	166,729,871 - 166,810,347	26,27
<i>KIF7*</i>	Kinesin family member 7	JBTS12/ACLS/HLS	15q26.1	90,171,200 - 90,198,681	28-30
<i>TCTN1</i>	Tectonic 1	JBTS13	12q24.11	111,051,831 - 111,086,934	31,32
<i>TMEM237</i>	Transmembrane protein 237	JBTS14	2q33.1	202,484,906 - 202,508,251	33
<i>CEP41</i>	41-kDa centrosomal protein	JBTS15	7q32.2	130,033,611 - 130,081,050	34
<i>TMEM138</i>	Transmembrane protein 138	JBTS16	11q12.2	61,129,472 - 61,136,976	11
<i>C5ORF42</i>	„chromosome 5 open reading frame 42“	JBTS17	5p13.2	37,106,329 - 37,249,529	35
<i>TCTN3</i>	Tectonic 3	JBTS18/OFD4	10q24.1	97,423,152 - 97,453,899	32,36
<i>TCTN2</i>	Tectonic 2	MKS8	12q24.31	124,155,659 - 124,192,949	37

Alle Proteine, die durch diese Gene exprimiert werden, lokalisieren an oder in primären Zilien und sind wesentlich an der Struktur oder der Funktion von diesen beteiligt (Referenzen in Tabelle 1). Der Verlust eines JBTS Proteins mittels *knockdown* oder *knockout* führt meist zu einer Störung der Struktur und/oder Funktion von primären Zilien. Über diesen Mechanismus resultiert vermutlich die Pathologie des JBTS, was das Joubert-Syndrom in die große Gruppe der Ziliopathien (siehe 3.3) einordnet.

3.2 Die Rolle von Zilien bei der Pathogenese des Joubert-Syndroms

3.2.1 Aufbau und Struktur von Zilien

Zilien wurden erstmals 1677 von dem niederländischen Naturforscher und Mikroskopbauer Antoni van Leeuwenhoek in Mikroorganismen als „*little legs*“, also kleine Beine, beschrieben und veröffentlicht³⁸. Zilien sind 2-20 μm lange und ca. 250 nm dicke membranassoziierte Zellorganellen in eukaryotischen Zellen, die sich von der Zelloberfläche vorstülpen; fast alle Zelltypen des menschlichen Körpers können Zilien bilden (Primary Cilia Research web page³⁹). Zilien werden klassischerweise durch die An- bzw. Abwesenheit eigenständiger Motilität klassifiziert. In der Regel basiert die Motilität von Zilien auf der Organisation und dem Aufbau der axonemalen Mikrotubuli. Das Axonem besteht aus einem Ring von neun peripheren Mikrotubuli-Doublets, die bei motilen Zilien durch Dynein-Komplexe miteinander verankert sind, und bildet das ziliäre Rückgrat. Das Axonem ist von einer Membran umgeben, die stufenlos in die Plasmamembran übergeht⁴⁰. Ausgehend von der Grundstruktur unterscheidet man zwei unterschiedliche Typen von Zilien. 9+2 Zilien besitzen zusätzlich ein zentrales Mikrotubulipaar, während 9+0 Zilien, auch Monozilien oder primäre Zilien genannt, dieses nicht haben. 9+2 Zilien findet man klassischerweise in respiratorischen Epithelien, im Reproduktionssystem (z.B. Spermien) und im zentralen Nervensystem, während primäre Zilien in den verschiedensten Geweben zu finden sind (u.a. Keratinozyten der Haut, Tubulusepithelzellen der Niere, Endothelzellen der Blutgefäße, etc.). Mit wenigen Ausnahmen sind 9+2 Zilien beweglich und 9+0 Zilien unbeweglich. Entlang des ziliären Axonems findet der bidirektionale Mikrotubuli-vermittelte Transport von Proteinen in und aus dem Zilium statt. Dieser intraflagelläre Transport (IFT) ist nicht nur für die Funktion von verschiedenen zilien-abhängigen Signaltransduktionswegen (siehe 3.2.2), sondern auch für die Bildung und Verlängerung von Zilien (Ziliogenese) essentiell. Das Axonem ist am Basalkörper verankert, der aus der älteren der beiden Zentriolen des Zentrosoms (Mutter-Zentriole) entsteht⁴¹. Da die Mutter-Zentriole auch einen Teil des Spindelpols während der Zellteilung darstellt, müssen Zilien in Säugetierzellen vor der Mitose abgebaut werden und können erst nach Abschluss der Mitose wieder gebildet werden⁴².

3.2.2 Funktion von Zilien

Zilien haben verschiedene Funktionen, abhängig vom Zelltyp und der Struktur des Ziliums. Im Gegensatz zu primären Zilien, findet man motile Zilien nur auf einer handvoll humaner Geweben. Durch ihre eigenständige Motilität können Spermien sich fortbewegen, befreien Zilien die Atemwege von Schleim oder bewegen Eizellen durch den Eileiter. Außerdem wird die rechts-links Asymmetrie in der Embryonalentwicklung durch motile, nodale Zilien durch Generierung eines linksgerichteten Flüssigkeitsstrom reguliert^{43,44}.

Primäre Zilien sind vor allem sensorische Organellen⁴⁵⁻⁴⁷ und spielen eine kritische Rolle in der Embryonalentwicklung und in der Homeostase adulter Gewebe⁴⁸⁻⁵⁰. Renale Monozilien z.B. reichen in die renalen Tubuli⁵¹ und scheinen dort an der Mechanosensation des Flüssigkeitsflusses beteiligt zu sein⁵²⁻⁵⁴. Zudem fungieren Zilien als Chemosensor für verschiedene Signaltransduktionswege. Zu den wichtigsten ziliär regulierten Signaltransduktionswegen gehören der *platelet-derived growth factor* (PDGF)-, Hedgehog (Hh)-, Wnt- und der *planar cell polarity* (PCP)-Transduktionsweg. Entsprechende Rezeptoren und/oder andere Komponenten sind in der ziliären Membran, der ziliären Basis oder im Zilium selbst lokalisiert⁵⁵⁻⁵⁹. Somit liegt nahe, dass auch umgekehrt die Ziliogenese und die Länge von Zilien vom Status dieser Signaltransduktionswege reguliert wird⁶⁰.

Für den Hh-Signaltransduktionsweg sind drei Hedgehog-Liganden bekannt: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh)⁶¹⁻⁶³. Ein Schema des Hh-Signalwegs ist in Abbildung 1 dargestellt. In Abwesenheit der Liganden wird der Signalgeber Smoothend (SMO) von den Hedgehog-Rezeptoren Patched 1 (PTCH1) und Patched 2 (PTCH2) inhibiert^{48-50,64-70}. Dies wiederum führt zur Degradation der Hedgehog-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3 in ihre Repressorform durch das Protein SUFU (*Suppressor of Fused*)⁷¹⁻⁷³. Durch die Anwesenheit von Hh-Liganden wird der Hh-Signalweg aktiviert. Die Hh-Liganden binden an die Patched-Rezeptoren, wodurch SMO aktiviert wird. Dadurch wird SUFU inhibiert, der GLI-Degradationskomplex aufgehoben und die GLI-Proteine können als Aktivatoren im Nukleus akkumulieren, was durch SUFU noch verstärkt wird^{74,75}. Die korrekte Lokalisation des Shh-Proteins SMO in der ziliären Membran ist essentiell für den Shh-Signalweg⁵⁶. Die Aktivierung des Hh-Signaltransduktionsweges führt am Ende zur Transkription Hh-spezifischer Zielgene^{68,76-78}.

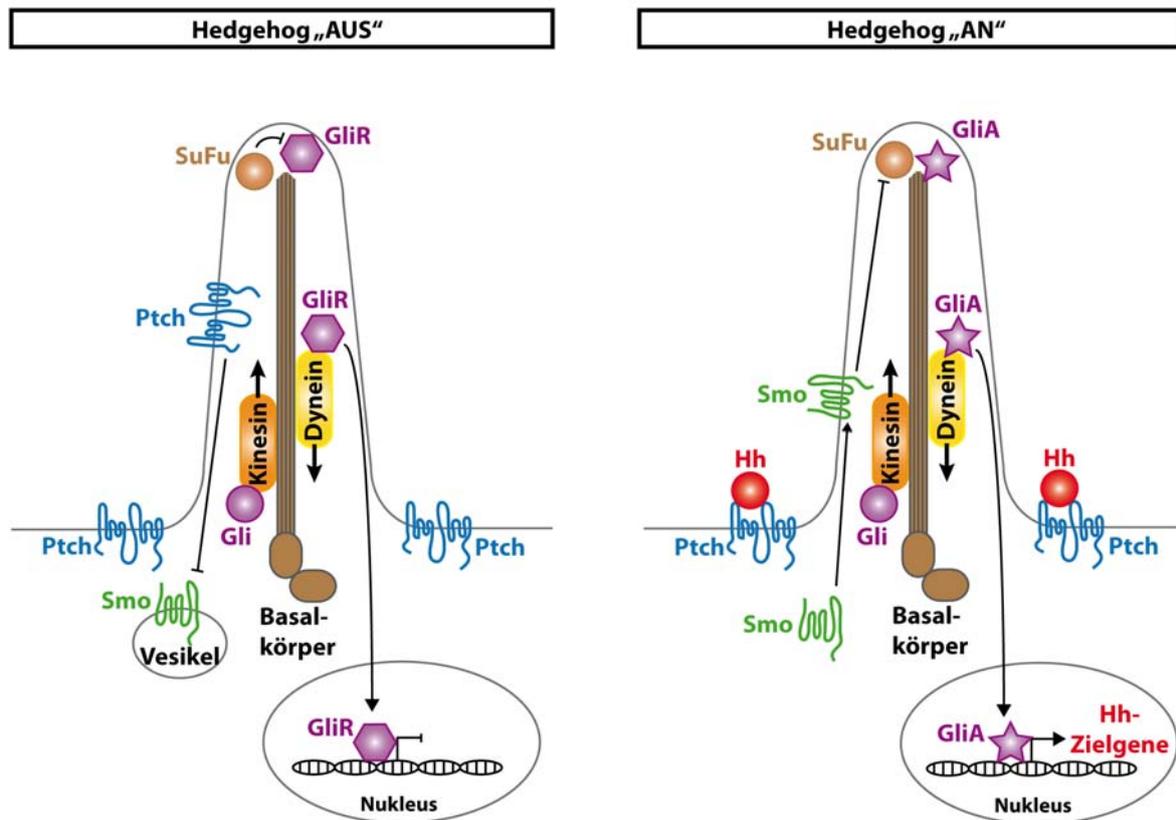


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hedgehog (Hh)-Signaltransduktionswegs in primären Zilien.

In Abwesenheit von Hh-Liganden (links, Hedgehog „AUS“) ist der Hh-Rezeptor Patched (Ptch, blau) im Zilium lokalisiert und inhibiert den Signalgeber Smoothend (Smo, grün). Die Gli-Transkriptionsfaktoren (Gli, pink, Kreis) werden mit anterograd-gerichteten Kinesin-Komplexen an die Spitze des Ziliums gebracht. Dort werden diese durch das Protein *Suppressor of Fused* (SuFu, braun) zur Repressorform (GliR, pink, Hexagon) degradiert und gelangen dann durch Dyneinkomplexe retrograd in den Nukleus, wo sie die Transkription Hh-spezifischer Zielgene inhibieren. Der Hh-Signalweg wird durch die Bindung von Hh-Molekülen (Hh, rot) an Ptch aktiviert (rechts, Hedgehog „AN“). SMO wird nicht länger inhibiert und gelangt in das Zilium, wo es SuFu und somit die Degradation von Gli-Proteinen inhibiert. Diese können dann als Aktivatorform (GliA, pink, Stern) im Nukleus die Transkription von verschiedenen Hh-Zielgenen aktivieren. Abbildung nach Ruat *et al.* (2012)⁷⁹.

3.2.3 Ziliäre Hypothese

Primäre Zilien galten lange Zeit als funktionslose Überbleibsel der Evolution. Diese Meinung änderte sich erst im Jahr 1999 als die Homologe der, bei der häufigen autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung betroffenen, Proteine Polycystin-1 und -2 (PKD1 und PKD2) in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (LOV-1 und PKD-2) identifiziert wurden. Es wurde gezeigt, dass beide Proteine in primären Zilien mechanosensorischer Neurone des Fadenwurms lokalisiert sind und das Paarungsverhalten der Männchen beeinflussen⁸⁰. Zudem wurde in einem Mausmodell für zystische Nierenerkrankung (*Orpk*-Maus) der Verlust eines essentiellen ziliären Proteins als Ursache für die Erkrankung nachgewiesen⁸¹. Diese

Beobachtungen stellten erstmals eine Verbindung zwischen primären Zilien und der polyzystischen Nierenerkrankung (PKD, *polycystic kidney disease*), her^{82,81,80,83–86}. Daraufhin wurde im Jahr 2004 der Begriff „ziliäre Hypothese“ von Pazour *et al.* formuliert⁸². Die ziliäre Hypothese besagt, dass nahezu alle Produkte von humanen Genen, die in zystischen Nierenerkrankungen mutiert sind, im primären Zilium oder am Basalkörperchen lokalisiert sind und/oder eine Funktion bei der ziliären Signalübertragung haben. Unterstützend wurde gezeigt, dass Mutationen in Genen, deren Produkte essentiell für die Ziliogenese sind, zu zystischen Nierenerkrankungen führen^{87,88}. Demnach sind polyzystische Nierenerkrankungen als Ziliopathien einzuordnen^{89–91}.

3.3 Ziliopathien

Als Ziliopathien werden genetische bedingte Erkrankungen bezeichnet, bei denen es durch Mutationen in Zilien-assoziierten Genen zur Funktionsstörung oder Abwesenheit von Zilien kommt. Folgende syndromale Erkrankungen gehören u.a. zur Gruppe der Ziliopathien (zusammengefasst in⁹²): Acrocallosal-Syndrom (ACLS), autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD, *autosomal dominant polycystic kidney disease*), autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD, *autosomal recessive polycystic kidney disease*), Bardet-Biedl-Syndrom (BBS), Hydrolethalus-Syndrom (HLS), Joubert-Syndrom (JBTS), Meckel-Gruber-Syndrom (MKS), Nephronophthise (NPH), Oro-fazio-digitales Syndrom (OFD) und Usher-Syndrom (USH).

Bedeutende betroffene Organe der Ziliopathien sind das Gehirn, die Nieren, die Leber und das Auge, aber auch weitere Organe können betroffen sein. Obwohl die phänotypische Erscheinungen der Patienten stark variieren, gibt es für einige Ziliopathien gemeinsame Merkmale, wie zerebrale Fehlbildungen, Nierenfehlfunktionen (zystische Nierenveränderungen), kognitive Schwächen, Netzhautdegeneration, Polydaktylie, muskuläre Hypotonie und Hyperpnoe/Apnoe⁹³. Mutationen in einigen Ziliopathiegenen können zu unterschiedlichen Syndromen führen. Dieser Effekt ist abhängig von der Position der Mutation im Gen und der Wirkung der Mutation auf das Proteinprodukt. Zum Beispiel können die Gene *TMEM216*, *TMEM67*, *CEP290*, *RPGRIP1L* und *CC2D2A* sowohl in Joubert-Syndrom als auch in Meckel-Gruber-Syndrom Patienten ursächlich sein^{9,10,17,19,21,23,94,95}. Für *INPP5E* wurden Mutationen in JBTS und MORM (*mental retardation, truncal obesity, retinal dystrophy, micropenis*) beschrieben, wobei auch hier die Lokalisation der Mutation den Phänotyp stark beeinflusst^{8,92,96,97}. Des Weiteren wurden Fälle von

oligogenetischer Vererbung und *modifier*-Genen in BBS und NPH beschrieben⁹⁸⁻¹⁰¹. Die meisten Patienten mit einer homozygoten *NPHP1* Mutation, die zu einer fehlenden *NPHP1* Funktion führen, entwickeln eine isolierte NPH. Allerdings verursacht eine zusätzliche heterozygote Mutation in *NPHP6*, die alleine keine Phänotypen auslöst, in diesen Patienten zusätzliche Symptome, wie retinale Degeneration und Ataxie¹⁰⁰. Alle bisher identifizierten JBTS Proteine (siehe Tabelle 1) sind wesentlich an der Struktur oder Funktion von primären Zilien beteiligt.

3.4 Das Mikrotubulus-Zytoskelett

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus Mikrotubuli-, Intermediär- und Aktin-Filamenten, welche dynamisch auf- und abgebaut werden. Es verleiht der Zelle mechanische Stabilisierung und somit ihre Form. Außerdem ist das Zytoskelett an der aktiven Bewegung der Zelle in ihrer Umgebung, Transportprozessen innerhalb der Zelle, der Positionierung verschiedener Organellen und der Zellteilung beteiligt. Das Zytoskelett kann spezialisierte Zellstrukturen, wie Lamellipodien, Flagellen oder Zilien formen.

3.4.1 Aufbau und posttranslationale Modifikationen von Mikrotubuli

Mikrotubuli sind hohl-zylindrisch geformte, nicht kovalent verknüpfte Polymere. Sie sind aus den Proteinen α - und β -Tubulin¹⁰² aufgebaut, welche zuerst Heterodimere und anschließend kettenartige Protofilamente bilden. 13 dieser Protofilamente verbinden sich dann in Anwesenheit von GTP zu Mikrotubuli (Abbildung 2). Diese erreichen einen Durchmesser von etwa 24 nm und eine Länge von bis zu 25 μ m. Mikrotubuli wachsen ausgehend von sogenannten Mikrotubuli-organisierenden Zentren (*microtubuli-organizing center*, MTOC), die mit Hilfe von γ -Tubulin und Ankerproteinen das Minusende verankern. Das Haupt-MTOC ist das Zentrosom, ein aus zwei senkrecht zueinander stehenden, zylinder-förmigen Zentriolen bestehendes Organell. Auch der Golgi Apparat ist in der Lage Mikrotubuli im Zytosol zu verankern^{103,104}. Das Gleichgewicht zwischen Mikrotubuliumaufbau und -abbau ist hoch dynamisch¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ und wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Diese als dynamische Instabilität beschriebene Eigenschaft¹⁰⁸ ist für die Regulation von Prozessen, die eine schnelle Reaktion erfordern, essentiell. Die Dynamik und Funktion von Mikrotubuli werden unter anderem durch Interaktionen mit anderen Proteinen, Motorproteine und Nicht-Motor-Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), moduliert. *Microtubule plus end tracking proteins* (+TIPs) stellen eine Gruppe von MAPs dar, die spezifisch an das Plusende von Microtubuli

Die Acetylierung des α -Tubulins ist eine der ersten posttranslationalen Modifikationen, die entdeckt wurden^{131,132} und findet nur an polymerisierten Mikrotubuli statt¹³³. Sie steht in direkter Verbindung mit lang-lebenden Mikrotubuli, wie z.B. in Zilien¹³⁴ und Axonen¹³⁵.

Bis vor wenigen Jahren war ausschließlich eine Acetylierung des α -Tubulins an der ϵ -Aminogruppe des Lysins 40 bekannt, welches sich in das Lumen des Mikrotubuluses erstreckt^{131,136,137}. Erst kürzlich konnten zusätzlich Acetylierungsstellen in α - und β -Tubulin in einer Proteomstudie identifiziert werden¹³⁸. Der Lysinrest 252 in β -Tubulin z.B. wird bevorzugt in nicht-polymerisiertem Zustand acetyliert¹³⁹.

Es ist nicht bekannt, wie die entsprechenden Enzyme die in das Mikrotubulolumen reichende Aminosäure zur Acetylierung bzw. Deacetylierung des α -Tubulin Lysins 40 erreichen. Bis heute konnten verschiedene Tubulin-acetylierende Enzyme (Acetyltransferasen) gefunden werden. *Mechanosensory abnormality 17* (MEC-17)/ α -Tubulin N'-Acetyltransferase 1 (α TAT1) ist die Acetyltransferase für α -Tubulin Lysins 40^{140,141}. Weitere Acetyltransferasen zeigten einen Effekt auf die Acetylierung von α -Tubulin Lysins 40, u.a. *Arrest-defective 1* (ARD1)/N-Acetyltransferase 1 (NAT1)¹⁴², der Elongator-Protein-Komplex (ELP)^{143,144} und *general control of amino acid synthesis 5* (GCN5)¹⁴⁵. Den Acetyltransferasen gegenüber agieren die Deacetylasen. Bisher konnten zwei Deacetylasen identifiziert werden, Histon-Deacetylase 6 (HDAC6)¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ und Sirtin 2 (SIRT2)¹⁴⁹. Es gibt eine Korrelation zwischen Tubulinacetylierung und Mikrotubulustabilität, wobei spekuliert wird, dass bereits stabile Mikrotubuli acetyliert werden und nicht die Acetylierung für eine Stabilisierung sorgt^{150,151}. Es wurde gezeigt, dass die Acetylierung von α -Tubulin zum Beispiel eine wichtige Rolle für die Bindung von Motorproteinen an Mikrotubuli hat^{135,152-154}.

3.4.2 Kinesine und der Transport entlang von Mikrotubuli

In der großen Gruppe von molekularen Motorproteinen, die im intrazellulären Transport beteiligt sind, unterscheidet man drei große Superfamilien: Kinesine¹⁵⁵, Dyneine¹⁵⁶ und Myosine^{157,158}. Myosine bewegen sich entlang von Aktinfilamenten und spielen hauptsächlich für die Muskelkontraktion eine Rolle. Dyneine sind für den retrograden Transport entlang von Mikrotubuli verantwortlich. Kinesine transportieren Cargo anterograd oder retrograd entlang von Mikrotubuli unter Verbrauch von Energie in Form von ATP.

Kinesine bilden eine Protein-Superfamilie mit über 650 identifizierten Mitgliedern¹⁵⁹. Für das humane Genom sind 45 Gene für Kinesine bekannt, die in 15 Unterfamilien eingeteilt werden (Kinesin 1-14b)¹⁵⁹⁻¹⁶². Diese können wiederum in drei Typen unterteilt werden, abhängig von der Position der Motordomäne. N-Kinesine haben die Motordomäne am Amino-terminalen

Ende und bewegen sich Richtung Mikrotubuli Plusende (anterograd). C-Kinesine haben die Motordomäne am Carboxy-terminalen Ende und wandern Richtung Mikrotubuli Minusende (retrograd). M-Kinesine haben die Motordomäne in der Mitte des Proteins und depolymerisieren Mikrotubuli^{161,163}.

Kinesine haben zwei wesentliche Funktionen in eukaryotischen Zellen. Zum einen sind sie für die verschiedenen Stadien der Zellteilung wichtig und sind an der Koordination der Mitose und der Zytokinese beteiligt^{164,165}. Zum anderen sind sie unabdingbar für den intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen¹⁶⁶. Kinesine transportieren ihr Cargo innerhalb der Zelle vor allem zwischen dem Golgi Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und der Plasmamembran. Neben Proteinen werden auch ganze Organellen von Kinesinen innerhalb der Zelle transportiert. Zum Beispiel werden Lysosomen in Abhängigkeit des pH-Wertes Richtung Peripherie oder Zellkern befördert. Auch Endosomen werden abhängig von ihrem „Alter“ von dem Zellinneren Richtung Zellmembran transportiert, wo sie dort mit dieser fusionieren. Es wurden bereits verschiedene Kinesine mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht¹⁶⁷.

3.4.3 Die Rolle von Kinesinen in primären Zilien

Neben ihrer Funktionen im Cytoplasma wurden für Kinesine bereits wichtige Rollen in primären Zilien beschrieben. Für die depolymerisierende Kinesinfamilie Kinesin 13 wurde in *Giardia*, *Leishmania major* (LmjKIN13-2) und *Chlamydomonas reinhardtii* (CrKinesin-13) eine axonemale Lokalisation und eine Beteiligung an der Kontrolle der Flagellumlänge gezeigt¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Zudem sind sie an der Regeneration von Flagellen beteiligt, indem sie die benötigten Tubulindimere durch Abbau von cytoplasmatischen Mikrotubuli zur Verfügung stellen¹⁷². KIF24, ein Mitglied dieser Kinesinfamilie 13, ist ein zentrioläres Kinesin, das durch die Kontrolle von Mikrotubulipolymerisation spezifisch die Ziliogenese reguliert¹⁷¹. Ein weiteres Beispiel ist das Kinesin KIF19A, das neben seiner Mikrotubulus-abhängigen Motoraktivität eine Mikrotubulus-depolymerisierende Funktion besitzt. KIF19A lokalisiert an der ziliären Spitze und reguliert dort die optimale Länge von motilen Zilien in Mäusen¹⁷³. Das N-Kinesin KIF3a ist essentiell für den anterograden Transport von Proteinkomplexen vom Basalkörper zur Zilienspitze (intraflagellarer Transport)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Der *knockout* von *Kif3a* im renalen Tubulussystem der Maus verursacht einen Verlust von Zilien in den betroffenen Zellen und eine darauffolgende Entstehung von Nierenzysten¹⁷⁷. Auch für KIF17 wurde gezeigt, dass es eine wesentlich Rolle für die ziliäre Lokalisation eines olfaktorischen Kanals hat, der für die Sensation von Stimuli wichtig ist¹⁷⁸. Ein weiteres ziliäres Kinesin ist KIF7,

welches während der Entwicklung in der Shh-Signaltransduktion fungiert und sich nach Aktivierung dieses Signalweges im Zilium von der Basis an die Spitze bewegt^{30,179}. Die Identifikation von Mutationen in *KIF7* als Ursache einer Ziliopathie (Joubert-Syndrom) und die Charakterisierung weiterer zellbiologischer Funktionen von KIF7 stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lösungen mit Angabe von Artikelnummer und Hersteller.

Chemikalie/Reagenz/Lösung	Artikelnummer	Hersteller
100 bp DNA ladder	N3231	New Englands Biolabs
StemPro [®] Accutase [®]	A11105-01	Gibco
Agarose	A9539	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	A0834	Applichem
Ampicillin-Natriumsalz	K029	Carl Roth
Aqua dest. Injectabile (PCR-Wasser)	PZN-1087335	Berlin-Chemie AG
Bovines Serum Albumin (BSA)	1066	Gerbu
Bromphenolblau	A512	Carl Roth
Collagen A	L7220	Biochrom
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (EDTA-frei)	11873580001	Roche
Coumeric Acid	C-9008	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max [™]	D2650	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	6908	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	D6429	Sigma-Aldrich
DMEM-F12	D6421	Sigma-Aldrich
Deoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Mix	200415	Stratagene
Essigsäure	7332	Carl Roth
Ethidiumbromid Lösung (1%)	2218	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E-5134	Sigma-Aldrich
Ethanol 96% + 1% Methylethylketon (MEK)	WAL641.5000	TH. Geyer
Ethanol 99,8%	9065	Carl Roth
Exonuclease I (ExoI)	M0293	NEB

Chemikalie/Reagenz/Lösung	Artikelnummer	Hersteller
FACSClean	340345	BD
FACSFlow™	342003	BD
FACSRinse	340346	BD
Fetales Bovines Serum (FBS)	S0115	Biochrom AG
Fetal renale cDNA Bibliothek (human)	780608	Stratagene
Ficoll® 400	F-2637	Sigma-Aldrich
GeneJuice® Transfection Reagent	70967	Novagen
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	SM031	Fermentas
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	SM037	Fermentas
D(+)-Glucose Monohydrat	104074	Merck
(L-)Glutamin 200mM Lösung	25030	Invitrogen
Glycerol	3783	Carl Roth
Glycin	3908	Carl Roth
<i>Human Multiple Tissue cDNA Panel I</i>	636742	Clontech
<i>Human Multiple Tissue cDNA Panel I</i>	636743	Clontech
Humane Retina RNA	-	Clontech
Hygromycin B	ant-hm	InvivoGen
Incidin Plus	3011520	Ecolab
Isopropanol 100%	5752	Carl Roth
Kaliumacetat (CH ₃ CO ₂ K)	104820	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	6781	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	P-018	Carl Roth
Kalziumchlorid-Dihydrat	HN04	Carl Roth
Kanamycinsulfat	T832	Carl Roth
LB-Agar	X965	Carl Roth
LB-Medium	X964	Carl Roth
Lipofectamine® 2000	11668	Invitrogen
Lipofectamine® LTX & Plus Reagent	15338	Invitrogen
LR ClonaseII Enzyme Mix	11791	Invitrogen
Luminol	9253	Fluka

Chemikalie/Reagenz/Lösung	Artikelnummer	Hersteller
Magnesiumacetat-Tetrahydrat ($\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	275	Carl Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	105833	Merck
Methanol 100%	4627	Carl Roth
<i>Mouse Multiple Tissue cDNA Panel I</i>	636757	Clontech
Natriumbicarbonat Lösung 7,5%	S8761	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	3957	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS) pellets	CN30	Carl Roth
Natriumfluorid (NaF)	S-1504	Sigma-Aldrich
(di-)Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	106574	Merck
(tetra-)Natriumdiphosphat-Decahydrate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)	106591	Merck
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	S6508	Sigma-Aldrich
<i>Normal Donkey Serum</i> (NDS), Eselserum	017-000-121	Dianova
Oligofectamine™	12252	Invitrogen
Opti-MEM (Optimem)	31985	Invitrogen
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26620	Fermentas
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	P7626	Sigma-Aldrich
Polyacrylamid (PAA)	T802	Carl Roth
Power SYBR® Green PCR Master Mix	4367659	Applied Biosystems
ProLong Gold antifade reagent + DAPI	P-36931	Invitrogen
Propidiumiodid (PI)	81845	Fluka
Protein G Sepharose beads	GEHE17-0618-01	VWR
Proteinase K	031158	Roche
QIAzol	79306	Qiagen
Ribonuklease A (RNase A), DNase-frei	A3832	Appllichem
Salzsäure 2N	T134	Carl Roth
Sepharose CL-4B	CL4B200	Sigma-Aldrich
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (SAP)	M9910	Promega
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367	Carl Roth
Tris Hydrochlorid (HCl)	9090	Carl Roth

Chemikalie/Reagenz/Lösung	Artikelnummer	Hersteller
Trizma Base	T1503	Sigma-Aldrich
Triton X-100	108603	Merck
Trypsin-EDTA Lösung (1x)	T3924	Sigma-Aldrich
Tween20	3472	Caesar&Lorentz
Wasser, DNase/Rnase-frei, Ultra Pure	10977	Invitrogen
Wasserstoffperoxid 30%	107209	Merck
Zeocin TM	ant-zn	InvivoGen

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien mit Angabe von Artikelnummer und Hersteller.

Material	Artikelnummer	Hersteller
10 cm Schale für LB-Agar-Platten	82.1473	Sarstedt
Blottingpapier (Typ BF4, 580 x 580)	FT-2-521-580580G	VWR
Deckgläser (rund, Ø 18 mm, Nr. 1.5)	631-0153	VWR
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	72.690.001	Sarstedt
FACS Röhrchen	352008	BD
Gefriermodul	479-0921	VWR
Gelkassette (1 mm)	NC2010	Invitrogen
Hemocytometer (Neubauer Improved)	-	BlauBrand
MicroAmp® Fast 96-well Reaktionsplatte	4346907	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystem
Millipore Immobilon-P Transfermembran	T831	Carl Roth
Kamm (10 Taschen, 1 mm) für Polyacrylamidgele	NC3010	Invitrogen
Kanüle Microlance TM 3 (23G x 1¼") – Nr.14	300700	BD
Kryogefäß (Nunc Cryotube TM)	368632	Thermo Scientific
PCR Soft-tubes 0,2 ml, klar	710920	Biozym
PCR Soft-tubes 0,2 ml 8 Tubes/flacher Deckel, klar	710970	Biozym
Pipettenspitzen (200 µl gelb)	70.762	Sarstedt

Material	Artikelnummer	Hersteller
Pipettenspitzen (1000 µl blau)	70.760.002	Sarstedt
Safe Lock 1,5 ml Eppendorf tubes	211-2130	VWR
Skalpell Nr.11	02.001.30.011	Feather
Spatel	3008	Corning
Spritze (Plastipak™ 1 ml)	7392/2007	BD
Stripetten (5 ml)	4051	Corning
Stripetten (10 ml)	4101	Corning
Stripetten (25 ml)	4251	Corning
TipOne (0,1-10 µl XL), steril	S1110-3810-c	Starlab
TipOne (1-200 µl beveled), steril	S1111-1816-c	Starlab
TipOne (101-1000 µl graduated), steril	S1111-2831-c	Starlab
Ultra-Clear Tubes (UZ Tubes)	344062	Beckman Coulter
Wiegeschale 140 x 140 mm	2159	Carl Roth
Wiegeschale 89 x 89 mm	2150	Carl Roth
Zellkulturschale (10 cm)	430167	Corning
Zellkulturschale (12-well)	3513	Corning
Zellkulturschale (6-well)	3516	Corning
Zellkulturschale (96-well F-Form)	655180	Greiner BioOne
Zellkulturschale (96-well U-Form)	650180	Greiner BioOne
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	188271	Greiner BioOne
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	227261	Greiner BioOne

4.1.3 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte mit Angabe von Model und Hersteller.

Gerät	Model	Hersteller
Analoger Röhrchen Roller	SRT6	Stuart
Autoklav	V-150	Systec
Avanti Zentrifuge	J-301	Beckman

Gerät	Model	Hersteller
Eppendorf Research® Multipipette (10-100 µl)	3122000043	Eppendorf
Fast Real-Time PCR System	7900HT	ABI
Fusion Solo Chemiluminometer	60-FU-SOLO	PeqLab
Geldokumentationssystem ChemiDoc™	XRS	Bio-Rad
Geldokumentationssystem	GDS	Intas
Hamilton Spritze (50 µl Type 705)	549-1155	VWR
HERAcell Inkubator	240	Heraeus
HERAcell Inkubator	150	Heraeus
Heraeus B12 Function Line Inkubator	50042307	Kendro Laboratory Products
Horizontales Electrophoresesystem (Agarose)	1582 – 030305	Dan-Kar
Inkubator (Agarose)	T 6030	Heraeus
Innova InkubatorSchüttler	4400	New Brunswick Scientific
Inverses Mikroskop	CK2	Olympus
JuLi™ Smart Fluorescence Cell Imager	DBJ01B	Bulldog Bio
Laminar Flow Sterilbank	HS12	Heraeus
Luminometer Mithras	LB940	Berthold Technologies
MacsMix Tube Rotator	MX100	Miltenyi Biotech
Mikroskop und Apotomesystem	Axiovert 200M	Carl Zeiss MicroImaging
Mikroskop, konfokal	LSM710	Carl Zeiss MicroImaging
Mikrozentrifuge	5424	Eppendorf
Mikrozentrifuge (Kühl-)	5415R	Eppendorf
Mikrozentrifuge (Kühl-)	5417R	Eppendorf
Multifuge	4KR	Heraeus
Nanodrop Spectrophotometer	1000	PeqLab
Pipetboy acu	155 015	Integra Biosciences AG
Pipetman Pipettenset (P2, P10, P100)	F167500	Gilson
Pipetman Pipettenset (P20, P200, P1000)	F167300	Gilson
Stromgeber (for Dan-Kar system)	EPS200	Pharmacia Biotech
Powerpac 200 Stromgeber	1655052	Bio-Rad

Gerät	Model	Hersteller
Powerpac 3000 Stromgeber	1655057	Bio-Rad
Schüttler (WB)	KS 260	IKA
Vakuumpumpe	MD4C	Vacuubrand
Thermocycler (MJ mini)	PTC-1148	Bio-Rad
Thermomixer Comfort 1,5 ml Thermoblock	5360 000.011	Eppendorf
Thermomixer Comfort shaker & heating plate	5355 000.011	Eppendorf
Ultrazentrifuge (Optima)	TLX-120	Beckman
Ultrazentrifugenrotor	TLA-55	Beckman
Vortexer/Schüttler	MS525-20	Heidolph (Reax)
Wasserbad	WNB 22	Memmert
Wasserbad (digital heating bath)	HBR4	IKA
Xcell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresesystem	100601-1408	Invitrogen
Zellsortierer	FACScan	BD
Zentrifuge (Kühl-)	5810 R	Eppendorf

4.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen mit Angabe der jeweiligen Zusammensetzung.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Annealingpuffer (2x)	60 mM HEPES 4 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ * 4 H ₂ O 200 mM CH ₃ CO ₂ K pH 7,4
BSA/PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 1% (w/v) BSA
Detektionlösung	100 mM Tris 1,25 mM Luminol 0,2 mM Coumaric acid 0,75% (v/v) H ₂ O ₂ pH 8,5

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
HEBS (2x)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,08
Frischblut-Lysepuffer	1 M NH ₂ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ -EDTA pH 7,4
Gesättigte NaCl-Lösung	6 M NaCl
HCl/Triton	2N HCl 0,5% (v/v) TritonX-100
IP-Puffer	20 mM Tris 1% (v/v) TritonX-100 50mM NaCl 15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 50 mM NaF pH 7,5
Kern-Lysepuffer	100 mM Tris 400 mM NaCl 2 mM Na ₂ -EDTA pH 8,2
Ladepuffer (6x)	20% (w/v) Ficoll 100 mM Tris 50 mM Essigsäure 2,5 mM EDTA Bromphenolblau pH 8,5
Laemmli-Puffer (1x)	50 mM Tris 2% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerol Bromphenolblau 50 mM DTT pH 6,8
Laemmli-Puffer (2x)	100 mM Tris 4% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerol Bromphenolblau 100 mM DTT pH 6,8
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Normale Kochsalzlösung	0,85% (w/v) NaCl

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS (Phosphate Buffered Saline, 1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS+ (1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂
PBS++ (1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ 0,1% (v/v) Triton X-100
PI-Mix	0,38 M Natriumcitrat 0,75 mM Propidiumiodid 0,73 mM Rnase A pH 7,0
Pronase	10 mg/ml Proteinase K
Sammelgel	250 mM Tris 5% (v/v) PAA 0,2% (w/v) SDS pH 6,8
SOC Medium	2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 8,6 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glukose pH 7,0
TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1mM EDTA pH 8,5
TE ⁻⁴ -Puffer	0,1 mM Tris 0,01 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer	25 mM Tris 188 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 15% (v/v) Methanol
Trenngel	750 mM Tris 10% (v/v) PAA 0,2% (w/v) SDS pH 8,8

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Tris-Puffer	10 mM Tris pH 8,0
Waschpuffer	30 mM Tris 300 mM NaCl 0,3% (v/v) Tween20 pH 7,5

4.1.5 Kits

Tabelle 6: Verwendete Assays und Kits mit Angabe von Artikelnummer und Hersteller.

Assay/Kit	Artikelnummer	Hersteller
Big Dye Terminator version 3.1 Sequencing kit	4337455	Applied Biosystems
Dual Luciferase Assay System	E1910	Promega
GeneJet™ PCR Purification Kit	K0702	Fermentas
GeneJet™ Gel Extraction Kit	K0692	Fermentas
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	K0503	Fermentas
High Capacity cDNA Reverse Transcription	4368814	Applied Biosystems
KOD Hot Start DNA polymerase kit	71086	Merck/Novagen
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	740414	Macherey-Nagel
NucleoBond® Xtra Midi Kit	740410	Macherey-Nagel
T4 DNA Ligase	EL0011	Fermentas
Venor® GeM Mycoplasma Detection Kit	11-1050	Minerva Biolabs
First-DNA all-tissue Kit	D 1002000	Gen-ial
Zenon® Tricolor Mouse IgG2b Labeling Kit	Z25260	Molecular Probes
Zenon® Tricolor Rabbit IgG Labeling Kit	Z25360	Molecular Probes

4.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper mit Angabe von Antigen, Klon, Wirt, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.

IF = Immunfluoreszenz, WB = Westernblot, * Nephrologisches Forschungslabor, Klinikum der Universität zu Köln in Kooperation mit Prof. Dr. H. Zentgraf, DKFZ, Heidelberg.

Antigen	Klon	Wirt	Verdünnung	Artikelnr.	Hersteller
V5 (GKPIPPELLGLDST)	monoklonal	Maus	1:10.000 in WB 1:1.000 in IF	MCA1360	Serotec
V5 (GKPIPPELLGLDST)	polyklonal	Kaninchen	1:1.000 in IF	AB3792	Millipore
FLAG (DYKDDDDK)	M2, monoklonal	Maus	1:10.000 in WB 1:1.000 in IF	F3165	Sigma
FLAG (DYKDDDDK)	polyklonal	Kaninchen	1:1.000 in IF	F7425	Sigma
Acetyliertes Tubulin	6-11B-1, monoklonal	Maus	1:1.000 in IF	T6793	Sigma
β -Tubulin	E7, monoklonal	Maus	1:50 in IF	E7	DSHB
α -Tubulin	12G10, monoklonal	Maus	1:50 in IF	12G10	DSHB
Pericentrin	polyklonal	Kaninchen	1:500 in IF	ab4448	Abcam
NPHP1	#62, monoklonal	Maus	1:50 in WB 1:20 in IF		*
pan 14-3-3 β (K-19)	polyklonal	Kaninchen	1:1.000 in WB	sc-629	Santa Cruz

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Antigen, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.

Antigen	Verdünnung	Artikelnr.	Hersteller
Cy3-AffiniPure Donkey α -Rabbit IgG (H+L)	1:500	711-165-152	Jackson Immuno Research
DyLight-488 AffiniPure Donkey α -Mouse IgG(H+L)	1:500	715-485-150	Jackson Immuno Research
DyLight-488 AffiniPure Donkey α -Rabbit IgG(H+L)	1:500	711-485-152	Jackson Immuno Research
DyLight-549 AffiniPure Donkey α -Mouse IgG(H+L)	1:500	715-505-150	Jackson Immuno Research
Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins/HRP	1:30.000	P0448	Dako
Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP	1:30.000	P0447	Dako

4.1.7 Plasmide

Tabelle 9: Verwendete Plasmide und deren Herkunft.

FL = *full length* (Volllänge), h = human, m = murin, r = aus der Ratte.

Plasmid	Anbieter/Herkunft
pcDNA TM 6/V5-His B	Invitrogen (V220-20)
psiCHECK TM -2	Promega (C8021)
<i>Renilla</i> luciferase pGL4.74	Promega (E6921)
FLAG.EPS ¹⁻²²⁵ pcDNA6	Nephrolab Cologne
FLAG.NPHP1 FL pcDNA6	Nephrolab Cologne
V5.NPHP1 FL pcDNA6	Nephrolab Cologne
FLAG.GFP pcDNA6	Nephrolab Cologne
V5.GFP pcDNA6	Nephrolab Cologne
FLAG.rPAR3 FL pcDNA6	Nephrolab Cologne
FLAG.mPAR6 FL pcDNA6	Nephrolab Cologne
FLAG.hVHL FL pcDNA6	Nephrolab Cologne
FLAG.mAPKC FL pcDNA6	Nephrolab Cologne
pRK5 VSV-G ts045-GFP	beschrieben in ¹⁸⁰
pOG44	Invitrogen (V6005-20)
pENTR TM 1A	Invitrogen (A10462)
pgLAP5	Addgene (19607)

4.1.8 Oligonukleotide/Primer

Wenn nicht anders markiert, wurden alle Primer zur Genotypisierung der Patienten und Kontrollen bei Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) und alle weiteren Primer (Klonierungen, Sequenzierung, siRNA, qRT-PCR) bei Biomers (Konstanz, Deutschland) bestellt. Das Oligonukleotid zur Klonierung von KIF7 FL wurde von GenScript (Piscataway, USA) synthetisiert.

4.1.8.1 Genotypisierungsprimer

Fett = Primer für Sequenzierung

Polymerasen: Taq = Taq DNA Polymerase, RED = REDTaq[®] ReadyMix[™] PCR Reaction Mix, QM = QIAGEN Multiplex PCR Kit

Zusätze: Q = 5x Q-Solution, DMSO = Dimethylsulfoxid

X = Hybridisierungstemperatur, Y = Elongationszeit, Z = Anzahl der Zyklen

Tabelle 10: Genotypisierungsprimer und PCR-Bedingungen für das Gen *TTC23*.

Exon	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragment (bp)	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (s)	Z
4	AGCAGGTCAGTAGTAGCCACC	GCTGTGCTTGGAGCCTAGAG	526	Taq	-	55	60	30
5	CATGCTACCACCCCAAATAG	ACAAAGTCTTCTGGCCCAAC	601	Taq	-	55	60	30
6+7	CCCAGATACGTCTCCATGTG	GCTCTGACATGACTGTGTTCC	751	Taq	-	55	60	30
8	AAACGAACCTGAACACCAGG	TGTTGTCCTTATCTAGAGCAAATG	411	Taq	-	55	60	30
9	CACATAAATCATTCTTCTAGCTTGC	CAAGGAAGGCTCTGTGGC	356	Taq	-	55	60	30
10	TCTTGTCCCAATACCTCTTTCC	AGAGACTGGCACATGCTTTG	360	Taq	-	55	60	30
11	GAGAACAGGCTCAGCTCGTG	TGTCATCCTATCTAAACAAGCCAC	391	Taq	-	55	60	30
12	CATCACAGCAGGGCCTAAG	TGCAAGTTATGGGAAGTCAGC	325	Taq	-	55	60	30
13	TCCTCTCATTATAGCCCCTACC	GGCCTTGGAATCTGTATCC	367	Taq	-	55	60	30

Tabelle 11: Genotypisierungprimer und PCR-Bedingungen für das Gen *NTRK3*.

Exon	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragment (bp)	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (s)	Z
2	GCATCTGATCGCTCGGCGTTTC	CACACGCATAGCCGGATCG	621	QM	-	55	60	35
3+4	AAGGCCTGGCAATCAATTAG	CAAAACCTTGCCCAAGAGC	882	Taq	-	55	60	30
5	TCCAAACCTGATCTATGCCC	CAACCAACCCAAGTAGGCTC	407	Taq	-	55	60	30
6	CCCTTCTCCCCTTAATCCC	ACTGCAGAGTTCAAGGCTGG	404	Taq	-	55	60	30
7+8	TCAAGCAGGTGGTGTTAGAGTC	CTGTCCCTACTGGTAGATCAGC	961	Taq	-	55	60	30
9	TTCCCTCAGCCTTTTCAGAG	TTGTTGCCCATGATAACAGTATG	539	Taq	-	55	60	30
10	CATGAGAACAGGGAATCATGG	TCACTCAGATGCCCTCAGC	268	Taq	-	55	60	30
11+12	AGAGCCTGGCTTTCAGAGG	TTAGACCCCATGACCGGAG	1206	Taq	-	55	60	30
13	ACACCAGAAACCCAAACAAC	TGAAACAAACAGGGAGGGTC	531	Taq	-	55	60	30
14	GCCTGCTGTAGGCTCAGAAC	CAAAGTCCTTTGATTGCATCTG	375	Taq	-	55	60	30
15	TTAGATTCATATTTATTGGTAACCCAG	TCATCTAATTTCTCATCCTGAGAGG	415	Taq	-	55	60	30
16	CATAGGCAGGATGGAAAGGG	TGGGCATGGGTGTGTATATG	493	Taq	-	55	60	30
17	TTTCCTAACTAATTTGAAGGAGCAC	TGAACACATTGCATTTTGGC	495	Taq	-	55	60	30
18	TGATAGAAGTTGCATAAAGCTGTG	CTGCTGGCTCTAAATCCCAC	408	Taq	-	55	60	30
19	GCCTAGCCTTTAGCTTGTGC	TTGTATGTGTAGCAGGCACTTG	467	Taq	-	55	60	30

Tabelle 12: Genotypisierungsprimer und PCR-Bedingungen für das Gen *RLBP1*.

Exon	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragment (bp)	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (s)	Z
3+4	TTCTAACCCCTGCAGCCC	GGCCAGTCTATCAGGTCCAG	657	Taq	2µl Q	60	60	35
5	CAGAAAAGCAAAGCTGCG	AAACTGACTTGCCCACAGTATG	455	Taq	-	55	60	30
6	GTTGAGTAGCCAGCTCGGTC	CCTCTACAGACCTTGCCCTCC	414	Taq	-	60	60	30
7	AAAGCCTGCAGCAAATTACC	GGCTGTCACTGCTCTTTATGG	407	Taq	-	50	60	30
8	CTGGAAATAGGACCTTCAG	CAGTGGGATCCACATAGCTC	372	Taq	-	55	60	30
9	GAGAGAGGTGTCGCCAGGC	CCACAGTCATCTCAAGCAG	384	Taq	-	55	60	30

Tabelle 13: Genotypisierungsprimer und PCR-Bedingungen für das Gen *KIF7*.

Exon	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragment (bp)	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (s)	Z
1	GGATATTGTGAACTTTGACCAC	CTGTCTAGGAAATCGACTCTTC	627	Taq	-	57	60	33
2	GCCTTCTCCATCCTAGAGCACC	CCATGAGGAGTTGCCATTCC	422	Taq	-	57	60	33
3	GCTTCTATACCCAGAGTGAGAG	CCACTGGTGTGCTGGACACTCC	675	Taq	5 µl Q	60	60	38
4-1	CTACCGCGACTCCAAGATCACC	GTAGGCGGCGTCCGGTGCAGG	560	Taq	5 µl Q	68	60	40
	GGAGTGTCCAGCACACCAGT							
4-2	GAGACCCGCATCATCCACC	GCTGCTGTCTGAAGACCCTC	385	Taq	5 µl Q	60	60	38
		CCACTCCCCACTGCCCACAACC						

Exon	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragment (bp)	Polymerase	Zusätze	X (°C)	Y (s)	Z
5	CTGCAGGTAGGGCTTGGAAG	GCTCATGTGCACCTCCTGAC	370	Taq	-	57	60	33
6	GATCTGTGGGGTGAGTTTGAG	CTGAGAGGCCAGAGTCATTC	597	Taq	5 µl Q	60	60	38
7	GAGCTGGATCACGAAGGTAAGG	CATGAGGGCATCCTAGGAC	380	Taq	-	57	60	30
8+9	CTGCCAGACTCACATCCTGG	GCTGAGTATCAAACCTAGG	713	Taq	-	57	60	30
10	GGTGCAAAGGCTTGGTGAAAC	GCTGGAGCACAAGGTTCCACAG	447	Taq	-	57	60	30
11	CTCCTGACCTCAAGTAATCC	GACTCAGGCTAAGTGACCTGC	542	Taq	5 µl Q	60	60	38
12	GATGAGGTATATGAGGTGACTGG	CCACCTCTGGCTGTGTCAGC	453	QM	-	67	60	35
13	GCTGACACAGCCAGAGGTGG	CTGTCTGGAACCTTACCTGG	463	QM	-	56	60	33
14	GCTGAGCAGAACATTTGGAG	CTTGGGTCTGCCGACAGCAAG	466	Taq	-	57	60	30
15	CGATGGGCTGACTTGGCCCTTG	GGATATCCGCTGGAGCAGCTGC	431	Taq	4 µl Q	60	60	30
16+17	GGCTGAGTCTTGGCTCAGCAGG	CCAGCACAATAAGCAACCTG	858	QM		67	60	35
18	GCTCTGAAGTCAGACCTGTTCC	CCTGGATTTAGGGTGTGCG	652	Taq	2 µl DMSO	57	60	30

4.1.8.2 Klonierungsprimer

Tabelle 14: Verwendete Klonierungsprimer mit Sequenz in 5'→3' Richtung, Fragmentgröße und Template.

FL = *full length* (Volllänge), h = human, r = aus der Ratte.

Konstrukt	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragment (bp)	Template
hHDAC6 FL	hHDAC6 MluI 1 fp CGC GGG ACG CGT ATG ACC TCA ACC GGC CAG GAT	hHDAC6 not* 1215 rp CGC GGG GCG GCC GCC TTA GTG TGG GTG GGG CAT ATC	3672	Fetale renale cDNA Bibliothek (human)
hKIF7 ⁵¹³⁻¹³⁴³	hKIF7 MluI 513 fp CGC GGG ACG CGT ATG GAG CAG TAC AAA CTG CAG	hKIF7 XbaI* 1343 rp CGC GGG TCT AGA TTA GCC TTC GGT GTA GAC	2517	cDNA Klon I.M.A.G.E. 8327739 (Thermo Scientific)
hKIF7 ⁵¹³⁻⁷⁷⁵	hKIF7 EcoRI 513 fp GAA TTC ATG GAG CAG TAC AAA CTG CAG	hKIF7 NotI* 775 rp GCG GCC GCC CTA CTG GAG CTC CTT GCC CTC G	804	cDNA Klon I.M.A.G.E. 8327739 (Thermo Scientific)
hKIF7 ¹⁰⁸³⁻¹³⁴³	hKIF7 EcoRI 1083 fp GAA TTC CTC ATG GCC AAG CTC AGC TAC C	hKIF7 NotI* 1343 rp GCG GCC GCC TTA CAG GGG GTT TTT CCG GAC	798	cDNA Klon I.M.A.G.E. 8327739 (Thermo Scientific)
hKIF7 3'UTR	hKIF7 3'UTR attb bp 4109 fp GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG CCC TCG GGG CAG ACC CTG CC	hKIF7 3'UTR attb bp 4575 rp GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CCA TTT GTC CCT TCA AAG AT	509	cDNA Klon I.M.A.G.E. 5724416 (Thermo Scientific)

Konstrukt	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragment (bp)	Template
hKIF7 FL	hKIF7 EcoRI 1 fp CGC GGG GAATTC ATG GGG CTG GAG GCT CAG AG	hKIF7 bp328 overlap rp CTC ATC CTC AAG GAG GGA GGC CAC ACT GGC CTC CCC CAT G	360	cDNA Klon I.M.A.G.E. 5724194 (Thermo Scientific)
	hKIF7 bp329 overlap fp CAT GGG GGA GGC CAG TGT GGC CTC CCT CCT TGA GGA TGA G	hKIF7 bp 1205 overlap rp (NotI) ACT CGG CGC CCA GGC GCA TGG CGG CCG CCG CGG AGG CGG T	917	cDNA Klon I.M.A.G.E. 5724194 (Thermo Scientific)
	hKIF7 bp1198 fp (NotI) CGC GGG GCG GCC GCC ATG CGC CTG GG	hKIF7 bp1543 rp (NcoI) CGC GGG CCA TGG CGT CCT CCA GCG CAG	372	Synthetisiertes DNA-Fragment (GenScript)
	hKIF7 NcoI 513 fp CGC GGG CCA TGG AGC AGT ACA AAC TGC AG	hKIF7 MluI* 1343 rp CGC GGG ACG CGT TTA CAG GGG GTT TTT CCG G	2518	cDNA Klon I.M.A.G.E. 8327739 (Thermo Scientific)
hKIF7 FL (für pgLAP5)	hKIF7 MluI 1 fp CGC GGG ACG CGT ATG GGG CTG GAG GCT CAG	hKIF7 EcoRV 1343 rp CGC GGG GAT ATC CAG GGG GTT TTT CCG GAC ATC	4056	FLAG.hKIF7 FL pDNA6
rPAR3 ¹⁻⁹³⁶	rPAR3 MluI 1 fp CGC GGG ACG CGT ATG ACC AAA GTG ACC GTG TGC	rPAR3 NotI* 936 rp CGC GGG GCG GCC GCT CAG GGC TTA TCG TAG GAC TTG	2837	FLAG.rPAR3 FL pcDNA6 (Nephrolab Cologne)
rPAR3 ⁹³⁷⁻¹³³⁷	rPAR3 MluI 937 fp CGC GGG ACG CGT ATG GTG GAT GAC GAC GAC G	rPAR3 NotI* 1337 rp CGC GGG GCG GCC GCC TCA GGA GTA GAA GGG CCG	1232	FLAG.rPAR3 FL pcDNA6 (Nephrolab Cologne)

4.1.8.3 Sequenzierungsprimer

Tabelle 15: Verwendete Sequenzierungsprimer, mit Angabe von Sequenz in 5'→3' Richtung und Richtungsangabe.

h = human, m = murin

Name	Sequenz (5'→3')	Forward	Reverse
pcDNA6 (-mlu) fsp1	CGT GTA CGG TGG GAG GTC TA	x	
pcDNA6 (-mlu) rsp 1	AGG AAA GGA CAG TGG GAG TG		x
pENTR_fsp RM	CTG TTA GTT AGT TAC TTA AGC TC	x	
pENTR P3 Be rsp	ATT TTG AGA CAC GGG CCA GA		x
KIF7-c.2F	CTT GAG GAT GAG CAG GGC ATT GTC	x	
KIF7-c.3/4F	CAA GAT CAC CCG GAT CCT CAA AG	x	
KIF7-c.7/8R	CTG ATC CTA TTT CTG CGC AGG		x
KIF7-c.11F	CCA GAG TGA GAA GCG ACT GCA GG	x	
KIF7-c.11/12R	GCT TCA GCT CCA GCT CCT TGA CG		x
KIF7-c.14/15F	CCG AGG AGG AGC GGA CGC TGT TC	x	
KIF7-c.15R	GCT TGG CCA TGA GGT TCA TCT CGC		x
KIF7-c.18F	GGA GAA GAG GAG CCT GTG CTC G	x	
KIF7-c.18R	CCT CCC GCT GCC TCA GTT CCT C		x
PAR3.PDZ1.fp (mlu)	GGG CGC ACG CGT CCC CTG GGA ATC CAT GTA GT	x	
PAR3.PDZ1.rp (not)	GGG CGC GCG GCC GCC CTA CGC TGC AGG GAC CAC GTG GA		x

Name	Sequenz (5'→3')	Forward	Reverse
PAR3.PDZ2.fp (mlu)	GGG CGC ACG CGT GGA CTG GGA TTT AGC ATC AC	x	
PAR3.PDZ2.rp (not)	GGG CGC GCG GCC GCC CTA TTC TTG ACG AAA GAC CAG AA		x
PAR3.PDZ3.fp (mlu)	GGG CGC ACG CGT GGG CTT GGT GTC AGC GTC AA	x	
PAR3.PDZ3.rp (not)	GGG CGC GCG GCC GCC CTA GAT CCG CCT CGC CAC GAT GA		x
hHDAC6 bp527 fsp	TGC ATC CGA ACT CAT ACT CC	x	
hHDAC6 bp1051 fsp	GAC CCC AAG GGT GAG ATG G	x	
hHDAC6 bp1595 fsp	CAG AGG CTG AGC TGC TCA CC	x	
hHDAC6 bp2127 fsp	CAT GGG TGA TGC TGA CTA CC	x	
hHDAC6 bp2586 fsp	GTT AGC TGA GCG GAT GAC C	x	
hKif7 mlu 1 fp	CGC GGG ACG CGT ATG GGG CTG GAG GC TCA G	x	
hKIF7 bp328 overlap rp	CTC ATC CTC AAG GAG GGA GGC CAC ACT GGC CTC CCC CAT G		x
hKIF7 bp329 overlap fp	CAT GGG GGA GGC CAG TGT GGC CTC CCT CCT TGA GGA TGA G	x	
hKIF7 bp 1205 overlap rp_new	ACT CGG CGC CCA GGC GCA TGG CGG CCG CCG CGG AGG CGG T		x
hKif7 bp-77 fp	CTGGGGATGGAAACCTGACT	x	
mKIF7-c.14/15F	CTG AGG AAG AGA GGA CAC TGT TC	x	
mKIF7-c.18R	TCT CCC GGA CCC TAG ACT CCT C		x

4.1.8.4 siRNA Oligonukleotide

Tabelle 16: Verwendete siRNA Oligonukleotide mit Angabe von Sequenz in 5'→3' Richtung und Hersteller.

siRNA Name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Hersteller
co siRNA	GUG ACA CGU UCG GAG AAT TAC	AAT TCT CCG AAC GUG UCA CGU	Biomers
<i>KIF7</i> siRNA#1	UUG UUG AUC CCA GUG AGG GUA TT	UAC CCU CAC UGG GAU CAA CAA TT	Biomers
<i>KIF7</i> siRNA#2	GCA AGU AUU UUG ACA AGG UTT	ACC UUG UCA AAA UAC UUG CAG	Ambion (Life Technologies)
Renilla siRNA	GGC CUU UCA CUA CUC CUA CTT	GUA GGA GUA GUG AAA GGC CTT	Biomers

4.1.8.5 qRT-PCR Primer

Tabelle 17: Verwendete qRT-PCR Primer mit Angabe von Sequenz in 5'→3' Richtung und Fragmentgröße.

Gen	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')	Fragmentgröße (bp)
hKIF7	GGC ACT GCC AGC CGT GAC AT	TCA CCC CGC ACA GCA CAA CA	67
hHPRT1	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT	94

4.1.9 Software

Tabelle 18: Verwendete Computerprogramme zur Darstellung und Auswertung der Daten.

Software	Anbieter
Adobe Acrobat Reader 9 Pro v9.4.4	Adobe Systems Inc.
Adobe Illustrator CS4 v14.0.0	Adobe Systems Inc.
ALOHOMORA	AG Nürnberg, CCG, Universität zu Köln
Axiovision v4.8	Carl Zeiss MicroImaging
BioEdit Sequence Alignment Editor	Tom Hall
Cyflogic v1.2.1	Perttu Terho
EditSeq v5.05	DNASTAR Inc.
FinchTV v1.4.0	Geospiza Inc.
Fusion-CAPT v15.16	Vilber Lourmat
GDS v3.10	Intas Science Imaging Instruments GmbH
GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) v4.1	Affymetrix
Genehunter v2.1	AG Nürnberg, CCG, Universität zu Köln
GTC 3.0.1	Affymetrix Genotyping Console
HapMap270	Affymetrix
HaploPrinter	AG Nürnberg, CCG, Universität zu Köln
Image Lab™	Bio-Rad
MapDraw v5.05	DNASTAR Inc.
Merlin	AG Nürnberg, CCG, Universität zu Köln
Microsoft Office 2003	Microsoft Corporation
MikroWin	Berthold Technologies
Nanodrop1000 v3.7	Thermo Scientific
PedCheck	AG Nürnberg, CCG, Universität zu Köln
SDS Software v2.4	Applied Biosystems

Tabelle 19: Verwendete online-verfügbare Datenbanken.

Software	Weblink
CiliaProteome	http://www.ciliaproteome.org/
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
ExonPrimer	http://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/primer/ExonPrimerUCSC.pl?db=hg19&acc=uc002bof.2
Human Protein Reference Database	http://www.hprd.org/query
NEB Double Digest Finder	http://www.neb.com/nebecomm/doubledigestcalculator.asp
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
NCBI Standard Nucleotide BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&DBSEARCH=true&QUERY=&SUBJECTS=
NCBI Standard Protein BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/

4.2 Methoden

4.2.1 Isolierung von DNA aus Vollblut

Für die Genotypisierung der Patienten wurde DNA aus Vollblut isoliert, was im Institut für Humangenetik der Uniklinik Köln von Serjoscha Blick und Katharina Zimmermann durchgeführt wurde. Des Weiteren wurde DNA durch Kooperationspartner zur Verfügung gestellt.

Zur Isolierung von DNA aus Vollblut wurden 5-10 ml EDTA-Blut mit Frischblut-Lysepuffer auf 50 ml aufgefüllt, durch invertieren gemischt und anschließend 15-30 Minuten auf Eis inkubiert. Wenn die Lösung klar geworden ist, wurden die Leukozyten abzentrifugiert (15 min, 1500 Upm, RT). Der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml Kern-Lysepuffer resuspendiert. Die enthaltenen Proteine wurden durch Zugabe von 330 µl 10% (w/v) SDS denaturiert und mit 250 µl Pronase über Nacht bei 37°C abgebaut. Nach Zugabe von 1,66 ml gesättigter NaCl-Lösung und schütteln, wurden ungewünschte

Zellrückstände abzentrifugiert (10 min, 4000 Upm, RT). Die sich im Überstand befindliche DNA wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 7 ml 100% Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit Hilfe einer Glaspipette kurz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 70% (v/v) Ethanol getaucht, luftgetrocknet und zum Schluss in 400 µl TE⁻⁴-Puffer resuspendiert.

4.2.2 Isolierung von DNA aus Wangenschleimhaut

Zur Gewinnung von DNA aus Wangenschleimhaut wurde das *First-DNA all-tissue Kit* (Gen-ial) benutzt und nach Angaben des Herstellers verfahren.

4.2.3 Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Zellen (U2OS, hTERT-RPE-1) wurde zuvor das Nährmedium entnommen und die Zellen wurden anschließend mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1,0 ml QIAzol wurden die Zellen mit Hilfe eines Spatel von der Zellkulturschale entfernt und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden entweder durch schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder durch mehrfaches Auf- und Abziehen durch eine G23 Kanüle in eine 1 ml Spritze lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT und Zugabe von 200 µl Chloroform (100%) wurde das Lysat kurz aufgeschüttelt und dann zentrifugiert (15 min, 12.000 G, 4°C). Anschließend wurde die obere, wässrige Phase (~500 µl) in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 700 µl Isopropanol (100%) versetzt und etwa 15 Minuten bei RT inkubiert. Die organische, unterste Phase (enthält DNA) und die mittlere Interphase (enthält Proteine) sollten beim Transfer gemieden werden. Die dabei ausfallende RNA wurde zuerst pelletiert (15 min, 12.000 G, 4°C) und danach mit 1 ml Ethanol (70% (v/v)) gewaschen (5 min, 7.000 G, 4°C). Nachdem die RNA an der Luft getrocknet war, wurde diese in 15 µl Tris-Puffer (pH 8,0) oder H₂O gelöst.

4.2.4 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Bestimmungen von DNA- oder RNA-Konzentrationen wurden am *NanoDrop* nach Herstellerangaben durchgeführt. DNA und RNA absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm. Durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm (OD₂₆₀), kann man die DNA- bzw. RNA-Konzentrationen bestimmen. Vor der ersten Messung wurde das Gerät mit der

Lösung in der die Nukleinsäure gelöst ist, abgeglichen. Mit Hilfe folgender Formel berechnet sich dann die Konzentration:

$$K [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \varepsilon \times \text{OD}_{260} \times \text{VF}$$

K = Konzentration; ε = Extinktionskoeffizient ($\varepsilon_{\text{DNA}} = 50$, $\varepsilon_{\text{RNA}} = 40$); VF = Verdünnungsfaktor

Die Reinheit der DNA/RNA ergibt sich aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, das optimal 1,8 für DNA und 2,0 für RNA beträgt.

4.2.5 Genomweite Kopplungsanalyse

Die genomweiten Kopplungsanalysen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Peter Nürnberg am Cologne Center for Genomics (CCG) der Universität zu Köln durchgeführt. Dazu wurden *GeneChip Human Mapping 10K 2.0 Arrays* (Affymetrix) verwendet. Diese erkennen ca. 10.000 SNPs, verteilt über das gesamte humane Genom, das entspricht einem durchschnittlichen Abstand zwischen den SNPs von 258 kb. Jeder dieser SNPs ist 40-mal als 25 bp Oligonukleotid auf dem Array vorhanden (*perfect match*- und *mismatch* Proben).

Pro Array wurden 250 ng genomische DNA nach Herstellerangaben aufgearbeitet und auf einer *GeneChip® Scanner 3000 7G-Plattform* (Affymetrix) analysiert. Die Daten wurden anschließend mit *GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE) 4.1* (Affymetrix) und *PedCheck*¹⁸¹ ausgewertet und parametrische und nicht-parametrische LOD-Werte mit Hilfe der Programme *MERLIN*¹⁸² und *GENEHUNTER2.1*¹⁸³ berechnet. Zur Darstellung der Haplotypen wurde die Software *HaploPrinter*¹⁸⁴ und *ALOHOMORA*¹⁸⁵ verwendet. Folgende Symbole wurden zur Erstellung und Interpretation von Stammbäumen benutzt.

□	männlich
○	weiblich
◇	Geschlecht unbekannt
■ ●	betroffen
□ ○	gesund
⊘	verstorben
□ — ○	Partnerschaft
□ = ○	Blutsverwandschaft

4.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine verbreitete Methode^{186,187}, um DNA für eine Vielzahl von Fragestellungen, zu amplifizieren. Bereits Anfang der 1970er Jahre hatte der Norweger Wissenschaftler Kjell Kleppe die Idee, DNA *in vitro* zu vervielfältigen¹⁸⁸. Jedoch war es Kary Mullis, der diesen Gedanken in die Praxis umgesetzt hat und 1993 dafür den Nobelpreis für Chemie verliehen bekam¹⁸⁹.

Definierte Abschnitte z.B. genomischer DNA können mittels PCR amplifiziert werden. Dazu benötigt diese verschiedene grundlegende Komponenten und Einzelschritte. Nach Denaturierung der Template-DNA (Ausgangs-DNA) zu Einzelsträngen bei 94-95°C (Denaturierung), lagern sich im zweiten Schritt die spezifischen Primer an die einzelsträngige DNA an (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge der Primer und dessen G/C-Gehalt. Primer sollten im Allgemeinen eine Länge von 18-30 Nukleotide und einen G/C-Gehalt von 40-60% haben. Mit einer vereinfachten Formel kann man die Schmelztemperatur der Primer bestimmen: $T_m = 4 \times (\text{Anzahl G/C}) + 2 \times (\text{Anzahl A/T})$. Anschließend synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase durch Verknüpfung einzelner deoxy-Nukleotide (dNTPs) an die Primer in 5'→3' Richtung den Komplementärstrang bei 72°C (Elongation). Die Elongationszeit ist abhängig von der Syntheserate der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Somit können bei optimalen Bedingungen Fragmente von 20-40 kb vervielfältigt werden. Der Puffer enthält die für die Polymerase essentiellen Magnesium-Ionen und stellt somit für die Polymerase eine geeignete chemische Umgebung sicher. Durch Zugabe von Additiven, z.B. DMSO oder Betain, kann die Spezifität der Polymerase gesteigert werden. Durch mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird innerhalb von 28-35 Zyklen das gewünschte DNA-Fragment für weitere Analysen, wie z.B. Sequenzierung oder Klonierung, bereitgestellt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 10, Tabelle 11, Tabelle 12, Tabelle 13 und Tabelle 14 zusammengefasst.

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dieser erhitzt und kühlt den PCR-Ansatz auf die gewünschte Temperatur. Um Kondensatbildung im Deckel zu vermeiden, wird dieser auf 100°C geheizt. Nach abgeschlossenem PCR-Programm wird ein Teil der Reaktion mit 6x Ladepuffer versehen und zur Kontrolle auf ein Agarosegel geladen (siehe 4.2.7).

Tabelle 20: Verwendete DNA Polymerasen mit Angabe der Syntheserate, der maximalen Leistung, der Anwendung innerhalb dieser Arbeit, der Artikelnummer und des Herstellers.

Polymerase	Syntheserate	Maximale Leistung	Anwendung	Artikelnr.	Hersteller
Taq DNA Polymerase	45-60 s/kb	3 kb	Standard-PCR, Mikrosatelliten	10342020	Invitrogen
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	45-60 s/kb	7 kb	Standard-PCR, RT-PCR	R2523	Sigma-Aldrich
Qiagen Multiplex PCR Kit	45-60 s/kb	3 kb	Standard-PCR (schwierige Amplicons)	206143	Qiagen
KOD Hot Start DNA Polymerase	~10 s/kb	12 kb	Klonierung	71086	Novagen

4.2.7 Agarosegelelektrophorese

DNA und RNA können mittels Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladene DNA läuft durch die siebartige Agarosematrix zur Anode. Diese Matrix formt feine Poren, durch die kleine Fragmente schneller laufen können als große. Je höherprozentiger die Agarosematrix, desto feiner sind die Poren und desto langsamer durchläuft die DNA die Matrix bei gleicher Spannung. Die Agarose wird in 1xTAE-Puffer, welcher auch den Laufpuffer darstellt, gelöst. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches sich zwischen die Basen einlagert und dann UV-Licht absorbiert, zur Agarose, kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Zur Längenbestimmung dienen DNA-Längenstandards (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, DNA Ladder 100 bp, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder). Zur Visualisierung der fertigen Agarosegele wurden die Geldokumentationssysteme ChemiDoc™ (Bio-Rad) und GDS (Intas) verwendet.

4.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

4.2.8.1 Enzymatische Aufreinigung

Um ein PCR-Produkt sequenzieren zu können, müssen zuerst unbenutzte Primer und dNTPs aus der PCR-Reaktion entfernt werden. Dazu wurden die PCR-Produkte mit den Enzymen *Exonuclease I* (ExoI) und *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) verdaut. Hierbei spaltet ExoI einzelne Nukleotide von einzelsträngiger DNA in 3'→5' Richtung ab, wobei die restlichen Primer abgebaut werden. SAP entfernt die Phosphatgruppen der dNTPs. Diese werden somit für eine weitere PCR unbrauchbar.

Standardansatz:

8 μ l	PCR-Produkt
0,3 μ l	SAP
0,075 μ l	ExoI
<u>1,625 μl</u>	ddH ₂ O
10 μ l	

Programm:

37°C	20 min
72°C	15 min

4.2.8.2 Säulenaufreinigung

Eine andere Methode DNA, entweder direkt aus der PCR-Reaktion oder aus einem Agarosegel, aufzureinigen, ist die Verwendung eines Aufreinigungskits (GeneJET™ PCR Purification Kit). Das Aufreinigungsprotokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.2.9 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden vom Sequencing Service des Cologne Center for Genomics (CCG, AG Nürnberg, Institut für Genetik, Universität zu Köln) bearbeitet. Dieser wendet die Sequenziermethode des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger¹⁹⁰ an. Durch Verwendung unterschiedlich fluoreszierender Dideoxy-Nukleotide¹⁹¹ (ddNTPs) neben den normalen dNTPs wird die Synthese zufällig nach Einbau eines ddNTPs abgebrochen, da die für die Verlängerung notwendige 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Dadurch entsteht eine Mischung verschieden langer PCR-Produkte, die abhängig vom eingebauten ddNTP unterschiedlich fluoreszieren. Die aufgereinigten PCR-Fragmente werden über eine Kapillare im Sequenziergerät elektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert.

Standardansatz:

1-3 μ l	PCR-Produkt (enzymatisch aufgereinigt)
2,0 μ l	Primer (1 μ M)
2,25 μ l	5x Sequenzierpuffer
0,25 μ l	BigDye v1.1 oder v3.1 (Applied Biosystems)
ad 10 μ l	ddH ₂ O

PCR-Programm:

96°C	1 min	}	39x
96°C	10 s		
55°C	5 s		
60°C	4 min		
10°C	∞		

Die fertigen Sequenzen konnten über ein internes Computersystem (<https://entry2ccg.ccg.uni-koeln.de/sequence/>) abgerufen werden.

4.2.10 Genotypisierung von Patienten und Kontrollen

Die Genotypisierung von Patienten und Kontrollpersonen wurde mittels PCR-Amplifikation (siehe 4.2.6) und anschließender Sequenzierung (siehe 4.2.9) durchgeführt. Die Primer (siehe Tabelle 11, Tabelle 10, Tabelle 12 und Tabelle 13) wurden mit Hilfe der Software ExonPrimer ermittelt. Zur Genotypisierung von Patienten und Kontrollpersonen wurden folgende Standardansätze verwendet.

Standardansatz:

2,5 µl	10x Puffer
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,75 µl	Forward-Primer (20 µM)
0,75 µl	Rerverse-Primer (20 µM)
0,1 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Invitrogen)
2,0 µl	DNA (20 ng/µl)
<u>17,65 µl</u>	ddH ₂ O
25 µl	

PCR-Programm:

95°C	5 min	}	Zx
95°C	1 min		
X °C	1 min		
72°C	Y		
72°C	10 min		
10°C	∞		

Die Variablen X, Y und Z waren abhängig von der Schmelztemperatur der Primer, der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Anzahl der Zyklen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Software FinchTV und NCBI Standard Nucleotide Blast ausgewertet und

Abweichungen mit bereits bekannten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs, aus Datenbank Ensembl) abgeglichen.

Tabelle 21: Bekannte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im Gen *KIF7*.

Exon	SNP Name	SNP Position
1	rs62021460 rs8179065 rs8179066 rs11630004 rs11630003	c.1-5 T>G c.154 G>A (p.D52N) c.195 G>C c.328+68 T>C c.328+69 T>C
2	rs4932240	c.529+67 A>G
3	-	-
4	rs8037349 rs8030837	c.1102 A>G c.1266 C>G
5	-	-
6	rs1110060	c.1788+13 T>C
7	-	-
8	rs894159	c.2038+53 T>C
9	-	-
10	rs35451920	c.2271 C>T
11	rs11633151 rs894156	c.2395-45 G>A c. 2395-43 G>A
12	rs3803531 rs3840030	c.2658 A>C c.2718+115_116 ins12/16 bp
13	rs3803530	c.2873 G>T
14	rs9672296 rs12900805 rs9672286	c.2896-14 G>A c.3013 G>A c.3048 G>A
15	rs35820949	c.3112-11_-12 insCT
16	rs12899599	c.3517+132 T>C
17	-	-
18	rs12914042	c.3665-116 G>C

4.2.11 Analyse von Haplotypen

Für die Analyse von Haplotypen wurden zunächst entsprechende Mikrosatellitenmarker bestimmter chromosomaler Regionen mittels PCR amplifiziert. Die Markierung der PCR-Produkte mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt direkt oder indirekt. Für die direkte Markierung verwendet man für die Amplifikation des Mikrosatellitenmarkers einen spezifischen, direkt fluoreszenzmarkierten Primer. Um das PCR-Fragment indirekt zu markieren, erhält einer der beiden Amplifikationsprimer einen Überhang, der komplementär zu einem zusätzlichen, fluoreszenzmarkierten Primer (HEX/FAM-CATCGCTGATTCGCACAT)¹⁹² ist.

Standardansatz:

2,5 µl	10x Puffer
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,75 µl	Forward-Primer (20 µM)
0,75 µl	Rerverse-Primer (20 µM)
[0,5 µl	Fluoreszenzprimer (20 µM)]
0,1 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Invitrogen)
2,0 µl	DNA (20 ng/µl)
<u>17,65 [17,15] µl</u>	ddH ₂ O
25 µl	

PCR-Programm:

95°C	5 min	} Zx
95°C	1 min	
X °C	1 min	
72°C	Y	
72°C	10 min	
10°C	∞	

Die Variablen X (Annealingtemperatur), Y (Elongationszeit) und Z (Anzahl der Zyklen) sind abhängig von den Primern und dem Amplifikat.

4.2.12 Expressionsanalyse

Zur Erstellung eines Expressionsprofils von *KIF7* wurde eine PCR (siehe 4.2.6) auf cDNA aus verschiedenen Geweben durchgeführt. Als Template dienten cDNAs aus verschiedenen humanen und murinen Geweben (Retina: revers transkribiert von retinaler RNA; Clontech, Blut: revers transkribiert von Gesamtblut-RNA; Kleinhirn: freundlicherweise bereitgestellt von B. Wirth, Humangenetik, Uniklinik Köln; andere Gewebe: *Human Multiple Tissue cDNA*

Panel I und *II*, *Mouse Multiple Tissue cDNA Panel I*, Clontech). Es wurden exon-überspannende Primer gewählt, um die Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden (Human: KIF7-c.11F + KIF7-c.15R, Fragmentgröße: 786 bp; Murin: mKIF7-c.14/15F + mKIF7-c.18R, Fragmentgröße: 815 bp). Durch die Visualisierung der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 4.2.7) konnte ein semi-quantitatives Expressionsprofil erstellt werden.

4.2.13 Klonierung

Als Klonierung bezeichnet man die Vermehrung eines gewünschten DNA Fragments in beliebiger Menge. Dazu wird das DNA Fragment in einen geeigneten Vektor integriert und kann anschließend z.B. in einem geeigneten Wirtssystem exprimiert werden.

4.2.13.1 Primerdesign und Amplifikation

Die Primer des zu klonierenden DNA-Fragments enthielten die ersten bzw. die letzten 18-22 bp der kodierenden Sequenz (CDS, *coding sequence*). Im Anschluss in 5'-Richtung wurde die Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme angehängt. Vorzugsweise wurden die Fragmente am 5'-Ende mit einer MluI-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einer NotI-Schnittstelle markiert. Um dem Restriktionsenzym die Erkennung zu erleichtern, wurde in 5'-Richtung der Erkennungssequenz noch eine sogenannte *clamp* angeschlossen. Alle Klonierungsprimer wurden bei der Firma Biomers bestellt.

Die primäre Amplifikation der CDS wurde mittels PCR (siehe 4.2.6) von einer entsprechenden cDNA Bank oder einem Plasmid durchgeführt. Dazu wurde die KOD Polymerase verwendet.

Standardansatz:

5,0 µl	10x Puffer
4,5 µl	MgSO ₄ (25 mM)
5,0 µl	dNTPs (2 mM)
1,0 µl	Forward-Primer (10 µM)
1,0 µl	Reverse-Primer (10 µM)
0,1 µl	KOD DNA Polymerase (1 U/µl, Novagen)
1,0 µl	cDNA/Plasmid-DNA (100 ng/µl)
<u>32,4 µl</u>	ddH ₂ O
50 µl	

PCR-Programm:

95°C	2 min	} Zx
95°C	20 s	
X °C	15 s	
70°C	Y	
70°C	10 min	
10°C	∞	

Die Variablen X (Annealingtemperatur), Y (Elongationszeit) und Z (Anzahl der Zyklen) sind abhängig von den Primern und dem Amplifikat.

Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 4.2.7) analysiert. Zeigte diese ein DNA-Fragment gewünschter Größe wurde dieses unter Verwendung des Säulensystems aufgereinigt (siehe 4.2.8.2).

4.2.13.2 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die in der Regel eine bestimmte DNA-Sequenz erkennen und die DNA dann (meist innerhalb der Erkennungssequenz) schneiden. So entstehen definierte, meist palindromische „klebrige“ Enden (sticky ends) mit einem einsträngigen Überhang.

Tabelle 22: Verwendete Restriktionsenzyme mit Angabe der optimalen Reaktionsbedingungen, der Artikelnummer und dem Hersteller.

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Temperatur	Artikelnr.	Hersteller
EcoRI	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'	NEBuffer 1, 2, 3, 4; EcoRI Puffer	37°C	R0101	New England Biolabs
EcoRV	5'-GAT ATC-3' 3'-CTA TAG-5'	NEBuffer 3 + BSA	37°C	R0195	New England Biolabs
MluI	5'-A CGCGT-3' 3'-TCGCG A-5'	NEBuffer 3	37°C	R0198	New England Biolabs
NcoI	5'-C CATGG-3' 3'-GGTAC C-5'	NEBuffer 1, 2, 3, 4	37°C	R0193	New England Biolabs
NotI	5'-GC GGCCGC-3' 3'-GCCCGG CG-5'	NEBuffer 3 + BSA	37°C	R0189	New England Biolabs
XbaI	5'-T CTAGA-3' 3'-AGATC T-5'	NEBuffer 2, 4 + BSA	37°C	R0145	New England Biolabs

Standardansatz:

3 µl	10x Puffer
[3 µl	10x BSA]
0,5 µl	Enzym (5 U/µl)
max. 1 µg	DNA
ad 30 µl	ddH ₂ O

Nach ca. 2-stündiger Inkubation bei angegebener Temperatur (37°C) wurde der gesamte Restriktionsansatz auf ein 1% (w/v)-iges Agarosegel geladen (siehe 4.2.7) und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten.

4.2.13.3 Gelextraktion

Die in 4.2.13.2 verdaute DNA wurde mit Hilfe eines Gelextraktionskits (GeneJet™ Gel Extraction Kit) aus dem Agarosegel extrahiert. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

4.2.13.4 Ligation

Ligation^{193,194} bezeichnet die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA- oder RNA-Stränge an ihren Enden. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäuresegmente mit Hilfe des Enzyms Ligase durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Das verdaute und aufgereinigte PCR-Fragment wurde zusammen mit dem Vektor und der Ligase in bestimmten Pufferbedingungen 30-120 min bei RT inkubiert.

Standardansatz:

2 µl	10x Ligationspuffer
2 µl	Vektor
4 µl	PCR-Fragment
0,4 µl	T4 DNA Ligase
<u>11,6 µl</u>	ddH ₂ O
20 µl	

4.2.13.5 Transformation

Transformation bezeichnet die nicht-virale Übertragung von freier DNA in kompetente Bakterienzellen. Es wurde der phagenresistente chemokompetente Bakterienstamm *E. coli DH10BT1* verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation der Bakterien mit der zu

transformierenden DNA auf Eis, wurden die Zellen einem Hitzeschock (45 s, 42°C) ausgesetzt. Dabei öffnen sich kleine Poren in der Zellmembran, die den Eintritt der DNA in die Zelle ermöglicht. Durch Zugabe von SOC Medium und der anschließenden Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler können sich die Bakterien erholen und werden zum Wachstum angeregt. Ein Teil der Zellen wurde dann auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml) ausgestrichen.

4.2.13.6 Bakterienkultur

Zur Vervielfältigung der klonierten Plasmide wurden Übernachtskulturen positiver Klone angefertigt. Dazu wurde LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einem Klon angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

4.2.13.6.1 Plasmidminipräparation

Die Präparation von Plasmiden in kleinen Mengen erfolgte mittels des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits (Fermentas) nach Herstellerangaben.

4.2.13.6.2 Plasmidmidi-/maxi-präparation

Für die Präparation von Plasmiden in größeren Maßstäben wurden die Kits NucleoBond® Xtra Midi und NucleoBond® Xtra Maxi nach den Angaben des Herstellers verwendet.

4.2.13.7 LR-Rekombination (Gateway® Klonierung)

Das Gateway® Klonierungssystem^{195,196,186} ist eine einfache molekularbiologische Methode, um DNA effizient zwischen Plasmiden zu transferieren. Dazu werden sogenannte „att“-Stellen und entsprechende Enzyme (LR Klonase und BP Klonase) benötigt. Da keine PCR-Amplifikation notwendig ist, bleibt der Leserahmen erhalten. Zuerst wird das DNA-Fragment von Interesse in einen Vektor kloniert, der die angrenzenden Rekombinationssequenzen „att L1“ und „att L2“ enthält (pENTR™1A). Ausgehend von diesem Plasmid kann das DNA-Fragment dann in alle Gateway®-kompatiblen („att R1“ und „att R2“-enthaltenen) Vektoren rekombiniert werden. Ausgang- und Zielvektoren wurden mit der LR-Klonase für 1 h bei RT inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 0,5 µl Proteinase K hinzugegeben und 10 min

bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz ohne LR-Klonase. Der Rekombinationsmix wurde dann in kompetente Bakterien transformiert (siehe 4.2.13.5).

Standardansatz:

75 ng	pENTR-Plasmid
75 ng	Zielvektor (pgLAP5)
1 µl	LR-Klonase
ad 4 µl	ddH ₂ O

4.2.14 siRNA Annealing

Einzelsträngige RNAs (Tabelle 16) wurden in Tris-Puffer (Tabelle 5) zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. Je 10 µl von Forward- und Reversestrang wurden mit 5 µl Wasser und 25 µl 2x Annealingpuffer (Tabelle 5) gemischt und nach einem Hitzeschock für 1 min bei 95°C für 1 h bei 37°C inkubiert. Um zu testen, ob der Annealingprozess erfolgreich war, wurde 1 µl der doppelsträngigen siRNA zusammen mit 1 µl eines Einzelstrangs auf ein 3% (w/v)-iges Agarosegel aufgetragen (4.2.7).

4.2.15 Zellkultur

4.2.15.1 Lagerung und Kultivierung von Säugetierzellen

Alle Zellkulturen wurden zur langfristigen Lagerung bei -186°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurde ein Kryogefäß möglichst schnell bei 37°C aufgetaut und die darin enthaltenen Zellen in ein vorbereitetes 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml vorgewärmten Medium (siehe Tabelle 23) transferiert. Die Zellen wurden einmal gewaschen, indem sie pelletiert wurden (5 min, 700 Upm, RT) und der Überstand abgenommen worden ist. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine 10 cm-Zellkulturschale transferiert. Für das optimale Wachstum der Zellen wurden diese bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Um mögliche bakterielle Kontaminationen frühstmöglich detektieren zu können, war das Medium mit dem Indikatorfarbstoff Phenolrot versetzt, welches bei sinkendem pH-Wert von rot nach gelb umschlägt. Dieser Farbumschlag wurde auch dann sichtbar, wenn Zellen so dicht gewachsen sind, dass sie alle Nährstoffe aus dem Medium bereits verbraucht haben. Da die Zellen nicht unter ständiger Antibiotikabehandlung kultiviert wurden, wurden neu aufgetaute Zellen auf Mycoplasmenbefall getestet. Dazu wurde das Venor® GeM Mycoplasma Detection Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

Hatten die Zellen eine bestimmte Dichte erreicht, wurden diese verdünnt und auf frische Schalen verteilt (sog. Spalten oder Passagieren). Zuerst wurden 8 ml frisches vorgewärmtes Medium in frische Schalen vorgelegt. Anschließend wurde das alte Medium entnommen und dann die Zellen einmal vorsichtig mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Um die adhären wachsenden Zellen von der Schale abzulösen, wurden diese in 1 ml Trypsin für ca. 2-5 min (abhängig von der Zelllinie) in Zellinkubator inkubiert. Trypsin ist ein Verdauungsenzym, welches extrazelluläre Proteine von den Zellen abspaltet und somit das Ablösen von der Schale verursacht. Die Zugabe von 9 ml Medium stoppt diese Reaktion. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension wurden die Zellen vereinzelt und dann auf die vorbereiteten Schalen verteilt und wiederum bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Zur Kultivierung in einer 12- oder 6-well Zellkulturschale wurden die Zellen nach der Trypsinbehandlung in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in Medium verdünnt und je 1 oder 2 ml der Zelllösung pro Well verteilt.

Zur langfristigen Lagerung von Zellen, wurden diese eingefroren. Dazu wurden die Zellen zunächst genauso behandelt wie beim Splitten. Nach dem Abstoppen des Trypsins, wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 700 Upm, RT) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (70% FBS, 20% Medium, 10% DMSO) resuspendiert und in eine Kryogefäß transferiert. Mit Hilfe eines Gefriermoduls, das den Einfrierprozess verlangsamt (ca. 1°C/min), wurden die Zellen zunächst bei -80°C eingefroren und später zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Tabelle 23: Verwendete Zelllinien, deren Ursprung, das entsprechende Medium und dessen Herkunft.

Zelllinie	Ursprung	Medium	Anbieter/Herkunft
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM + 10% FBS	Gerd Walz, Uniklinik Freiburg
hTERT-RPE-1	Humane retinale Pigmentepithelzellen	DMEM-F12 + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin + 7,5% Natriumbicarbonat	ATCC
Flp-In NIH-3T3	Murine Fibroblasten (einfach integrierte FRT-Sequenz)	DMEM + 10% FBS	Invitrogen
U2OS	Humane Osteosarkomazellen	DMEM + 10% FBS	Christian Reinhardt, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln

4.2.15.2 Transfektion von Säugetierzellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Nukleinsäuren (DNA und RNA) in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet die transiente (kurzweilige) Transfektion von der stabilen (dauerhaften) Transfektion.

4.2.15.3 Transfektion mittels Kalziumphosphat-Präzipitation

Die Kalziumphosphat-Präzipitation¹⁸⁶ ist ein häufig verwendetes Transfektionsverfahren zur transienten Expression von Proteinen in Säugerzellen. Hierbei nutzt man die Fähigkeit dieser Zellen aus, Kalziumphosphatkristalle durch Endocytose aufzunehmen.

Die Zellen wurden zur Transfektion am Vorabend gesplittet und zu einer Dichte bis etwa 20-30% kultiviert. Die zu transfizierende DNA wurde in CaCl₂ (0,25 M) vorgelegt. Durch tropfenweise Zugabe der gleichen Menge 2x HEBS unter ständigem Schütteln (Vortexer) bildeten sich Kalziumphosphatkristalle, an die die DNA gebunden ist. Da diese Kristalle sehr instabil sind, wurde die Lösung innerhalb weniger Minuten tropfenweise auf die Zellen verteilt. 6-8 Stunden nach der Transfektion wurde einmalig das Medium gewechselt. Nach eintägiger Inkubation bei 37°C und 5% konnten die Proteine geerntet werden.

Tabelle 24: Verwendete Maximale DNA-Menge und die CaCl₂ und 2x HEBS Volumina bezogen auf die Größe der Zellkulturschale.

Zellkulturschale	max. DNA-Menge (µg)	CaCl ₂ /2x HEBS-Volumen (µl)
10 cm	20	500
6-well	4	100
12-well	2	50

4.2.15.4 Transfektion mittels Lipofektion

Eine andere weitverbreitete Methode Säugetierzellen mit Nukleinsäuren zu transfizieren ist die Lipofektion^{186,197}. Hierbei verwendet man kationische Lipide, die Plasmid-DNA oder auch siRNAs binden. Diese Komplexe können dann von der Zelle aufgenommen werden. Folgende kommerziell erhältlichen Lipofektionsreagenzien wurden für verschiedene Zwecke nach Angaben des Herstellers genutzt (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Verwendete Lipofektionsreagenzien mit Angabe der Zelllinie und dem Verwendungszweck.

Reagenz	Zelllinie	Zweck
Oligofectamine™	RPE-1, U2OS	Transfektion von RNA
Lipofectamine® 2000	HEK293T	Transfektion von DNA oder RNA
Lipofectamine® LTX & Plus Reagent	Flp-In NIH-3T3	Transfektion von DNA

4.2.15.5 Transfektion mittels komplexen Transfektionsreagenzien

Zu den bereits genannten Transfektionsmethoden gibt es relativ neue Substanzen zur Transfektion von DNA in verschiedene Zelllinien¹⁸⁶. Das hier verwendete Reagenz *GeneJuice® Transfection Reagent* wurde zur Transfektion von DNA in RPE-1 Zellen benutzt. Es setzt sich aus einem nicht-toxischen zellulären Protein und einer geringen Menge eines neuartigen Polyamins zusammen. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

4.2.16 Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen

Bevor mit der Isolierung der Proteine aus den Zellen begonnen wurde, wurde zunächst die Transfektionseffizienz bestimmt. Dafür wurden Zellen in einer separaten Schale mit Grünfluoreszierendem Protein (GFP) transfiziert. Unter UV-Licht konnte der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen im Verhältnis der Gesamtzellzahl geschätzt werden. Dieser Wert stellt die Transfektionseffizienz dar. Lag der Wert unter 70%, wurden die Zellen verworfen.

Zuerst wurde das Medium von der Zellkulturschale entfernt und die Zellen in 10 ml 1x PBS aufgenommen. Stark adhärent wachsenden Zellen wurden mit einem Spatel von der Schale gelöst. Nach dem Pelletieren der Zellen (5 min, 1.000 Upm, 4°C) wurden diese in 1 ml IP-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis lysiert. Zur Hemmung der Aktivität von Proteasen und Phosphatasen wurden entsprechende Inhibitoren zum IP-Puffer hinzugefügt (Protease-Inhibitor PMSF [final 2 mM] oder PIM [Protease Inhibitor Mix, *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, final 1x], Phosphatase-Inhibitor Na₃VO₄ [final 44 µg/µl]). Durch Zentrifugation wurden die festen Zellbestandteile pelletiert (30 min, 13.200 Upm, 4°C). Der Protein-enhaltene Überstand (Lysat) wurde entweder für eine weitere Aufreinigung erneut ultrazentrifugiert (30 min, 45.000 Upm, 4°C) oder direkt weiterverarbeitet. Wurden die Lysate nicht in einer Co-Immunopräzipitation (siehe 4.2.17) eingesetzt, wurden sie 1:1 in 2x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C gekocht, auf ein SDS-Gel (siehe 4.2.18) geladen und bei -20°C gelagert.

Um die Gesamtheit der Proteine der Zellen untersuchen zu können, wurden die Zellen nach dem Pelletieren als sogenannte *whole-cell-lysates* (WCL, Lysate aus der ganzen Zelle) geerntet. Dazu wurde das Zellpellet in 1x Laemmli-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 95°C gekocht.

4.2.17 Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von Proteinen

Diese Methode wurde angewandt, um zu zeigen, ob zwei Proteine miteinander interagieren. Dazu wurden diese Proteine mit unterschiedlichen so genannten *tags* (meist FLAG und V5) exprimiert. Diese *tags* sind kurze spezifische Aminosäuresequenzen, gegen die hochspezifische Antikörper verfügbar sind. Sie wurden bei der Klonierung C- oder N-terminal an das entsprechende Protein fusioniert (siehe 4.2.13). Nach der Isolierung der Proteine (siehe 4.2.16), wurde nun zuerst 1 µg eines Primärantikörpers zu dem Lysat hinzugegeben, der gegen eins der beiden Protein-*tags* gerichtet war. Dieser konnte während einer mindestens 30-minütiger Inkubation bei 4°C auf einem Rotator an das entsprechende *tag* binden. In einem zweiten Schritt wurden dann 30 µl *beads* (kleine Sepharose-Kügelchen, beschichtet mit Protein G) hinzugegeben, die wiederum den zugegebenen Primärantikörper binden. Nach weiteren 30 min auf dem Rotator bei 4°C wurden die *beads* pelletiert und dreimal mit IP-Puffer gewaschen (3 min, 5.000 Upm, 4°C). Durch Zugabe von 30 µl 2x Laemmli-Puffer und 5-minütigem Kochen bei 95°C wurden die Proteine von den *beads* gelöst und denaturiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene SDS sorgt für die Auflösung von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen und das DTT zerstört Disulfidbrücken zwischen und innerhalb der Proteine.

4.2.18 Diskontinuierliche SDS-PAGE

SDS-PAGE (Abkürzung für englisch *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)¹⁸⁷ ist eine Methode zur Analyse und Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Im Gegensatz zur Agarosegelelektrophorese verwendet man hierbei eine Gelmatrix auf Polyacrylamid- (PAA) basis. Die Proteine wurden durch das ionische Detergenz SDS und die Hitzebehandlung bei 95°C denaturiert und Disulfidbrücken durch Zugabe von DTT zerstört. Da alle Proteine dadurch in ihrer Primärstruktur vorlagen, konnte sich das im Puffer enthaltene SDS gleichmäßig an die Proteine anlagern und diesen ihre negative Ladung verleihen.

Die Gele für die diskontinuierliche SDS-PAGE bestehen aus zwei Schichten, dem Sammelgel und dem Trenngel. Die Proteine werden zunächst im pH neutralen Sammelgel an der Grenze zwischen den beiden Schichten konzentriert und dann im basischen Trenngel in Laufpuffer aufgetrennt (30 min, 70 V; 100 min, 25 mA/Gel). Mit Hilfe eines Größenstandards (Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas) konnten die Größen der Proteine geschätzt werden.

4.2.19 Westernblot (WB)

Westernblot bezeichnet die Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Zunächst musste die Membran für ca. 30 s in 100% Methanol aktiviert werden. Anschließend wurden die Membran und das Gel in Transferpuffer gewaschen und das Blottingpapier darin eingelegt, damit es sich vollsaugen konnte. Das Sandwich für den Transfer wurde wie folgt zusammgebaut: Papier, Membran, Gel, Papier. Überschüssiger Puffer und eventuelle Luftblasen wurden mit Hilfe eines Spatels entfernt. Die Proteine wurden bei 12 V für ca. 60 min transferiert.

4.2.20 Immunfärbung von WB

Nachdem die Proteine im WB auf die Membran transferiert worden sind, konnten einzelne Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper auf der Membran nachgewiesen werden. Zunächst wurde die Membran in 5% (w/v) BSA in Waschpuffer inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blocken. Anschließend wurde die Membran gewaschen (3x 5-10 min in Waschpuffer) und in Primärantikörper entsprechender Verdünnung inkubiert (1 h, RT oder o/n, 4°C). Der primäre Antikörper wurde wiederverwendet. Nach erneutem Waschen (3x 10 min in Waschpuffer) der Membran wurde diese in HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:30.000) inkubiert (30 min, RT). Nachdem der letzte Waschschrift (3x 10 min in Waschpuffer) abgeschlossen war, wurde der WB entwickelt. Durch Zugabe von frisch gemischter Detektionslösung entsteht ein Lichtsignal, welches im digitalen Fusion Chemiluminometer (PeqLab) detektiert wurde.

4.2.21 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen wurden diese mindestens 12 h zuvor auf runde Deckgläschen (Ø 18 mm, Dicke 1 mm) ausgesät. Nachdem die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht haben, wurden diese einmal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder 5-10 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) bei RT oder 5 min in 100% Methanol (-20°C) auf Eis fixiert. Nach drei Waschschrritten in 1x PBS+ für 5 min bei RT, wurden die Zellen permeabilisiert und unspezifische Bindestellen in 5% Normal Donkey Serum (NDS in 1x PBS++) für 1 h bei RT geblockt. Nach weiteren drei Waschschrritten (1x PBS+) für 10 min bei RT, wurden die Zellen im ersten Primärantikörper (in 1x PBS++) für 1 h bei RT inkubiert und erneut dreimal für 10 min bei RT gewaschen (1x PBS+). Sollte noch ein zweites Protein angefärbt werden, wurde nun der zweite Primärantikörper (in 1x PBS++) ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert und wieder gewaschen. Die Primärantikörperverdünnungen wurden mehrfach verwendet und dazu mit Natriumazid (NaN_3 , 0,1% (w/v)) versetzt und bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen in fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper (in 1x PBS++) für 30 min bei RT vor Licht geschützt inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen nach drei letzten Waschschrritten bei RT (dunkel) mit ProLong Gold mit DAPI eingedeckelt. Dadurch wird die Haltbarkeit der Leuchtkraft der Fluorophore verlängert und gleichzeitig die DNA im Zellkern durch das DAPI angefärbt.

4.2.22 Elektronenmikroskopie

Ein Elektronenmikroskop kann ein Objekt mit Hilfe von Elektronen abbilden. Es erreicht dabei eine wesentlich höhere Auflösung (~0,1 nm) als ein Lichtmikroskop (~200 nm). Zur elektronenmikroskopischen Analyse von Zellen wurden diese nach der Kultivierung von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Addicks (Institut I für Anatomie, Klinik der Universität zu Köln, Köln, Deutschland) weiterverarbeitet. Dazu wurden die Zellen zuerst in frischer EM-Fixierung (0,1 M Natriumkakodylat, 2% (v/v) Glutaraldehyd, 0,2% (v/v) Pikrinsäure, pH 7,4) fixiert und anschließend mit 1%-igem (w/v) Osmiumtetroxid (in 0,1 M Natriumkakodylat) behandelt. Die Proben wurden in einer abfallenden Ethanolreihe dehydriert (enthält einen Uranylacetat *en bloc* Färbeschritt in 70% (v/v) Ethanol). Nach der Infiltration mit Epon Epoxydharz (Fluka) wurden die Proben bei 60°C für 60 h hausgehärtet. Danach wurden 60 nm dünne Schnitte angefertigt (Ultracut UCT Ultramicrotom, Reichert). Vor der Analyse

der Schnitte mit einem Zeiss EM902 Elektronenmikroskop (LEO) wurden diese noch mit 1%-igem Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt.

4.2.23 VSV-G Assay

Eine Methode, um die Funktionalität des Golgi Apparat zu untersuchen, ist der VSV-G Assay¹⁹⁸. Dazu werden die Zellen mit der ts-O45-G thermosensitiven Variante des the *vesicular stomatitis viral G* Proteins VSV-G¹⁹⁹ transfiziert. Das GFP-markierte Transmembranprotein hat die Eigenschaft bei 39,5°C im Endoplasmatischen Reticulum (ER) zu akkumulieren und wird dann nach einer Temperatursenkung auf 32°C durch den sekretorischen vesikulären Transport geleitet.

RPE-1 Zellen wurden mit *GeneJuice* transfiziert und direkt nach der Transfektion bei 40°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 16 h wurden die Zellen weiter bei 33°C und 5% CO₂ inkubiert und nach den angegebenen Zeiten mit 4% (w/v) PFA für 10 min fixiert. Zur Ermittlung der *knockdown*-Effizienz wurden die Zellen mit den Golgi Antikörper GM130 gegengefärbt und in ProLong Gold mit DAPI eingedeckt.

4.2.24 Migrationsassay

Um die Migrationsfähigkeit eine Zelllinie zu untersuchen, wurde ein Migrationsassay durchgeführt. Dazu wurden siRNA-transfizierte RPE-1 Zellen (co siRNA, *KIF7* siRNA#1) mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer „improved“, Bioanalytik) ausgezählt und dann ca. 10.000 Zellen in eine *ibidi* μ -Zellkulturschale mit „*culture-insert*“ ausgesät. Dieser Einsatz verhindert Zellwachstum außerhalb der vorgesehenen Fläche und kann nach Anhaftung der Zellen am Schalenboden mit einer sterilen Pinzette entfernt werden. Durch die Doppelkammer konnte das Migrationsverhalten der Kontrollzellen und der *KIF7 knockdown* Zellen im gleichen Versuchsaufbau beobachtet werden. Nach 16 h Kultivierung wurde das „*culture-insert*“ entfernt, die Schale mit 2 ml Medium aufgefüllt und für 24-48 h alle 15 min am konfokalen Mikroskop mit dem 10x Objektiv im DIC Kanal eine Aufnahme gemacht.

4.2.25 Durchflusszytometrie Analyse

Die Durchflusszytometrie (auch FACS, *fluorescence activated cell sorting*) beschreibt ein Messverfahren, in dem einzelne Zellen in einem hohen Tempo analysiert und sortiert werden können. Für diese Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Zellzyklus von

Zellen durchgeführt. Dazu wurden siRNA-transfizierte (co siRNA, *KIF7* siRNA#1) U2OS Zellen zuerst einmal mit 1x PBS gewaschen und dann ~10 min mit 200 µl Accutase bei 37°C inkubiert, damit sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale (6-well) lösen. Die Zellen wurden in 5 ml BSA/PBS aufgenommen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und pelletiert (5 min, 1500 Upm, 4°C). Anschließend wurden die Zellen 2x in BSA/PBS gewaschen (5 min, 1500 Upm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 100 µl normaler Kochsalzlösung resuspendiert und die Zellsuspension zur Fixierung der Zellen in 100% Methanol (-20°C) auf dem Vortexer getropft und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach dem Pelletieren (10 min, 1500 Upm, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml HCl/Triton resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei RT inkubiert (Permeabilisierung). Nach erneutem Pelletieren (5 min, 1000 Upm, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml Propidiumiodid (PI) Mix gelöst und 30 min bei RT inkubiert. PI interkaliert in Nukleinsäuren (wie Ethidiumbromid), was zu einer Verschiebung der Absorptions- bzw. Emissionsmaxima führt. Als letztes wurden die Zellen nochmals pelletiert (5 min, 1000 Upm, 4°C) und in ~100 µl normaler Kochsalzlösung resuspendiert. Zur Analyse im Zellsortierer wurden die Zellen in FACS Röhrchen in FACSCFlow™ verdünnt und die Einstellungen für den *Forward Scatter* (FSC) und den *Side Scatter* (SSC) den Zellen angepasst. Pro Messvorgang wurden ~20.000-30.000 Zellen im FL2-Kanal, welcher die PI-Emission aufnimmt, gemessen. Zur Reinigung des Geräts wurden die Schläuche mit FACSClean und FACSRinse gespült. Die Auswertung der Daten wurde mit der Cyflogic Software durchgeführt.

4.2.26 Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkription¹⁸⁶ wird RNA in komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) überführt. Die Reaktion läuft ähnlich ab wie die PCR (siehe 4.2.6). In einem geeigneten Puffer verlängert die Reverse Transkriptase die an die RNA bindenden Primer durch Anlagerung von dNTPs. Es werden grundsätzlich drei Typen von Primern unterschiedenen. (i) Für die Transkription einer bestimmten Transkriptsequenz werden in der Regel sequenzspezifische Primer verwendet. (ii) Oligo(dT)-Primer sind etwa 15-20 bp lange Oligotymidine, die an das Poly(A)-Ende der mRNA hybridisieren. Somit werden nur mRNAs, welche nur 2-4% des Gesamt-RNA-Gehaltes ausmachen, synthetisiert. (iii) Random-Oligonukleotide (meist Hexamere) haben eine statistische Basenzusammensetzung und binden folglich an verschiedene Stellen der RNA-Moleküle. Allerdings wird mit Random-Oligonukleotide die gesamte RNA-Population inklusive ribosomaler RNA und tRNA in cDNA umgeschrieben. Sekundärstrukturen in RNA-Moleküle, die die Bindung eines

spezifischen Primers unmöglich machen, kann man durch die Verwendung von Random-Hexameren umgehen.

Für die Reaktion wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* verwendet. Dieses arbeitet mit Random-Oligonukleotiden.

Standardansatz:

2 μ l	10x Puffer
0,8 μ l	25x dNTP Mix (100 mM)
2,0 μ l	10x RT Random Primers
1,0 μ l	MultiScribe™ Reverse Transkriptase
10 μ l	RNA (200 ng/ μ l)
<u>14,2 μl</u>	ddH ₂ O
20 μ l	

Programm:

25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 s
4°C	∞

4.2.27 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Um auf die Menge an eingesetztem DNA- oder RNA-Template zu schließen, empfiehlt sich eine quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) ¹⁸⁶. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (siehe 4.2.6). Die Quantifizierung erfolgt in Echtzeit mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. Das Lichtsignal, welches durch DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe entsteht, wird nach jedem Reaktionszyklus gemessen und steigt direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt. Die Quantifizierung der Fluoreszenz wird in der exponentiellen Phase der qRT-PCR vorgenommen. Somit kann man direkte Rückschlüsse auf die Menge an eingesetztem DNA-Template schließen, und z.B. zwischen homozygoten und heterozygoten Merkmalsausprägungen unterscheiden.

Die Primer für die qRT-PCR wurden mit der NCBI Primer-BLAST Software entworfen. Die optimale Größe des von den Primern eingeschlossenen Fragments liegt zwischen 50 und 150 bp. Außerdem sollte das Fragment eine Exon-Exon-Grenze (und ein dazwischenliegendes Intron von mindestens 1000 bp) überspannen, um die Amplifikation genomischer DNA und somit die Notwendigkeit eines DNase-Verdaus zu vermeiden.

Als Template wurden 50 ng cDNA, RNA oder genomische DNA eingesetzt. Von den zutestenden Proben wurde zunächst RNA isoliert (siehe 4.2.3) und diese mittels reverser Transkription (siehe 4.2.26) weiterverarbeitet. Die dadurch gewonnene cDNA wurde dann in die qRT-PCR eingesetzt. Als Kontrollen dienten zum einen die isolierte RNA, genomische DNA (siehe 4.2.1) und Wasser (als *non-template control*, NTC), um die Menge an genomischer Amplifikation einzuschätzen.

Alle weiteren für eine PCR nötigen Bestandteil, wie Puffer, dNTPs, Polymerase, und auch der Fluoreszenzfarbstoff waren in dem Power SYBR® Green PCR Master Mix enthalten.

Standardansatz:

12,5 µl	Power SYBR® Green PCR Master Mix
10,35 µl	ddH ₂ O
0,15 µl	Primermix (je 50 mM)
<u>2,0 µl</u>	Template (25 ng/µl)
25 µl	

PCR-Programm:

95°C	10 min	} 40x
95°C	15 s	
60°C	1 min	

Für die relative Quantifizierung wird das Verhältnis der Anzahl der Zielmoleküle zu der Anzahl von endogenen Referenztranskripten berechnet. Das Referenzgen sollte in allen Proben gleichermaßen exprimiert sein und möglichst nicht von der experimentellen Behandlung der Zellen beeinflusst werden. Daher eignen sich sogenannte *housekeeping*-Gene besonders gut als Referenzgene. Für diese Arbeit wurde das Referenzgen Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) verwendet.

4.2.28 Luciferase Assay

Der Luciferase Assay ist eine Methode, um z.B. die *knockdown*-Effizienz von siRNAs zu quantifizieren. Dazu kloniert man die Zielsequenz, gegen die eine siRNA gerichtet ist, in einen sogenannten psiCHECK™-2 Vektor (Tabelle 9). Dieser enthält die kodierende Sequenz der *Renilla* Luciferase (isoliert aus der Seefeder *Renilla reniformis*) und die *Firefly* Luciferase (isoliert aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*). Durch spezifische Reagenzien werden von den beiden Luciferasen unterschiedliche Lichtsignale erzeugt, deren Stärke im Mithras

gemessen werden kann. Die kodierende Sequenz der *Renilla* ist direkt an die Zielsequenz, die als künstliche 3'UTR fungiert, fusioniert und wird somit durch diese reguliert, wogegen die *Firefly* nicht reguliert wird und somit als Transfektionskontrolle dient. Durch Bindung der siRNA an die Zielsequenz, wird die Fusions-RNA abgebaut und somit weniger Licht von der *Renilla* emittiert im Verhältnis zur *Firefly*.

Zur Durchführung eines Luciferase Assays wurden HEK293T Zellen im 96-well Format mittels Lipofectamin 2000 mit dem psiCHECKTM-2 Vektor und der zu testenden siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Zelllysat im Luminometer gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Identifikation von Mutationen in *KIF7* in JBTS Patienten

Die im Folgenden charakterisierte Familie stammt aus Ägypten und wurde von Herrn Dr. med. Solaf Mohamed Elsayed (Medical Genetics Center und Kinderklinik, Ain Shams Universität, Kairo, Ägypten) betreut. Der Stammbaum der Familie (Abbildung 3A) ließ sich über vier Generationen (I-IV) rekonstruieren. DNA-Proben beider betroffenen Kindern, der Geschwistern, sowie der konsanguinen Eltern wurden von Dr. Elsayed zur molekulargenetischen Charakterisierung zur Verfügung gestellt. Klinisch zeigen beide Patienten (E1 und E2) die charakteristischen Symptome eines JBTS (Abbildung 3B). Die Gesichter präsentieren die klassischen kraniofazialen Abnormalien, wie einen großen Kopf, eine prominente Stirn, hohe und gerundete Augenbrauen, ein dreieckiger Mund mit abwärtsgerichteten Mundwinkeln, eine verbreiterte Nasenbasis, weitstehende Augen, eine ausgeprägte Epikanthus-Falte und nach unten geneigte Lidspalten. In der axialen Magnetresonanztomographie des Gehirns zeigt sich deutlich das pathognomonische Backenzahnzeichen (Abbildung 3B, roter Pfeil). Zusätzlich weist die Patientin E1 eine Hexadaktylie am linken Fuß und an beiden Händen auf, die allerdings an den Händen bereits im Säuglingsalter operativ korrigiert wurde.

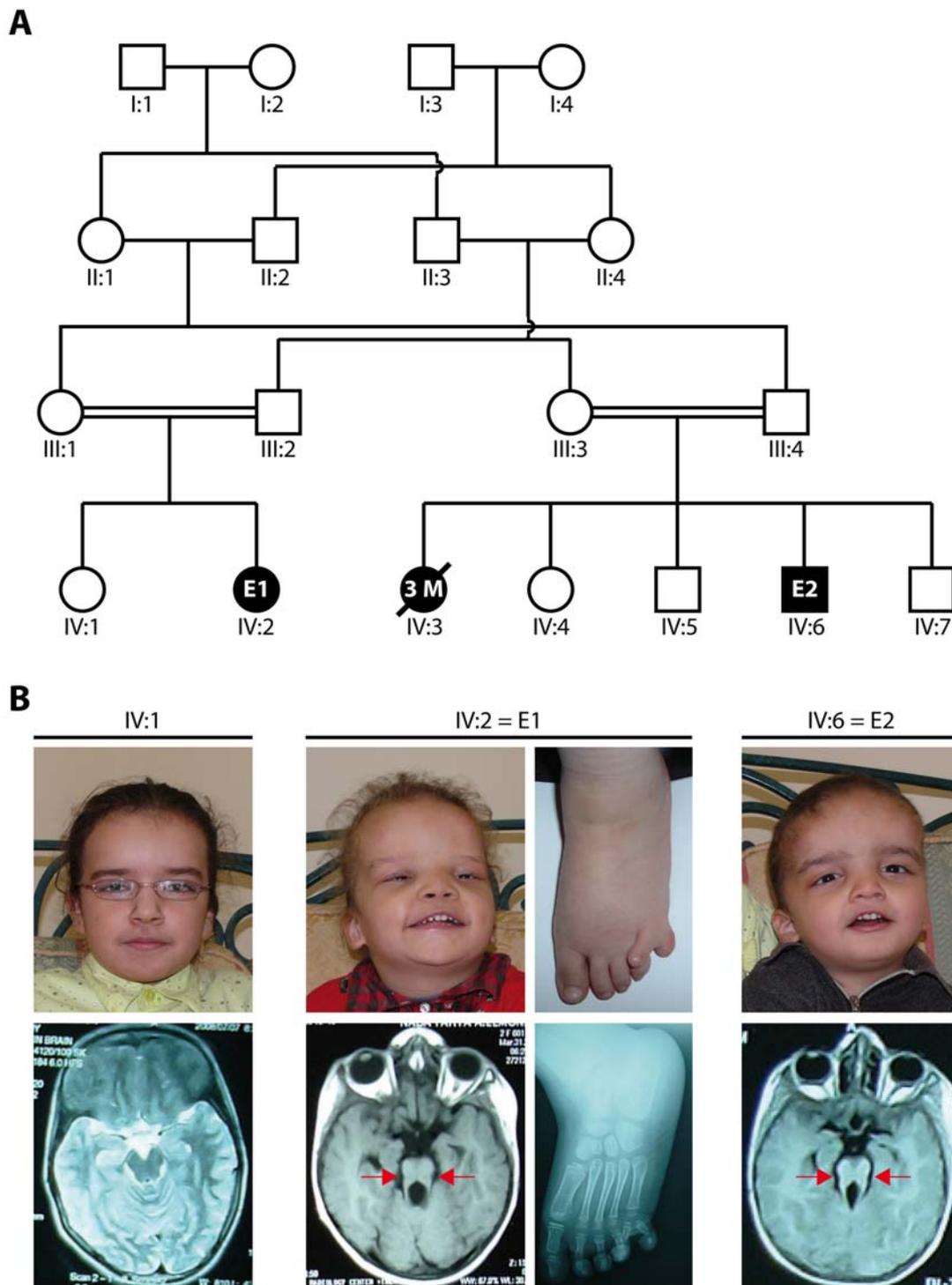


Abbildung 3: Stammbaum und klinische Symptomatik der betroffenen ägyptischen Familie.

(A) Rekonstruierter Stammbaum in vier Generationen (I-IV). Zwei Kinder (IV:2 = E1 und IV:6 = E2) konsanguiner Eltern (III:1 bis III:4) zeigen in der vierten Generation die klinischen Zeichen eines JBTS. Eine Schwangerschaft (IV:3) wurde aufgrund fetaler Auffälligkeiten nach drei Monaten (3M) abgebrochen. (B) Symptome der betroffenen Kinder und der gesunden Schwester von E1 (IV:1). Beide Patienten zeigen die klassischen kraniofazialen Abnormalitäten und auch das MTS (rote Pfeile im MRT). E1 zeigt zusätzlich Hexadaktylie am linken Fuß. Die gesunde Schwester von E1 (IV:1) zeigt keine Symptome eines JBTS. Die klinische Diagnose der Patienten wurde von Dr. med. Solaf Mohamed Elsayed (Medical Genetics Center und Kinderklinik, Ain Shams Universität, Kairo, Ägypten) erstellt. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

Nach Ausschluss bereits bekannter JBTS Loci mittels Haplotypanalyse (im Vorfeld durchgeführt von Dr. rer. nat. Inga Ebermann), wurde eine genomweite Kopplungsanalyse in Kollaboration mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Nürnberg (Cologne Center for Genomics (CCG), Universität zu Köln, Köln, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden DNA-Proben beider betroffenen Kinder (E1 und E2), einer gesunden Schwester (IV:1) und der Eltern (III:1 bis III:4) analysiert. Auf Grund der Blutsverwandtschaft der Eltern wurde von einem rezessiven Erbgang (*homozygosity by descent*) ausgegangen. Unter dieser Annahme wurden für die zwei potentiellen Loci 7p15.3-p21.2 und 15q25.3-q26.3 maximale parametrische LOD-Werte von jeweils 2,5 berechnet. Homozygotität in Regionen bekannter JBTS Gene wurde in den Patienten nicht gefunden. Die Haplotypanalyse weiterer Marker war nicht mit dem Locus auf Chromosom 7 vereinbar. Ein 15,3 Mb großer Bereich auf Chromosom 15 wurde von den SNPs rs717552 (Position 84.884.126) und rs352744 (Position 100.169.952) begrenzt. Durch Analyse der Mikrosatelliten D15S1030 (rs113910275, 87.555.280-87.555.460), D15S1514 (rs113581797, 95.554.044-95.554.129) und D15S120 (rs113105119, 99.592.191-99.592.307) konnte die Homozygotität dieser Region bestätigt und weiter eingegrenzt werden. Abbildung 4 veranschaulicht die Ergebnisse der Haplotypanalyse. Alle Elternteile tragen das krankheitsverursachende Allel (rot) im heterozygoten Status. Die betroffenen Kinder sind für dieses Allel homozygot, während die gesunden Geschwister für das Allel maximal heterozygot sind.

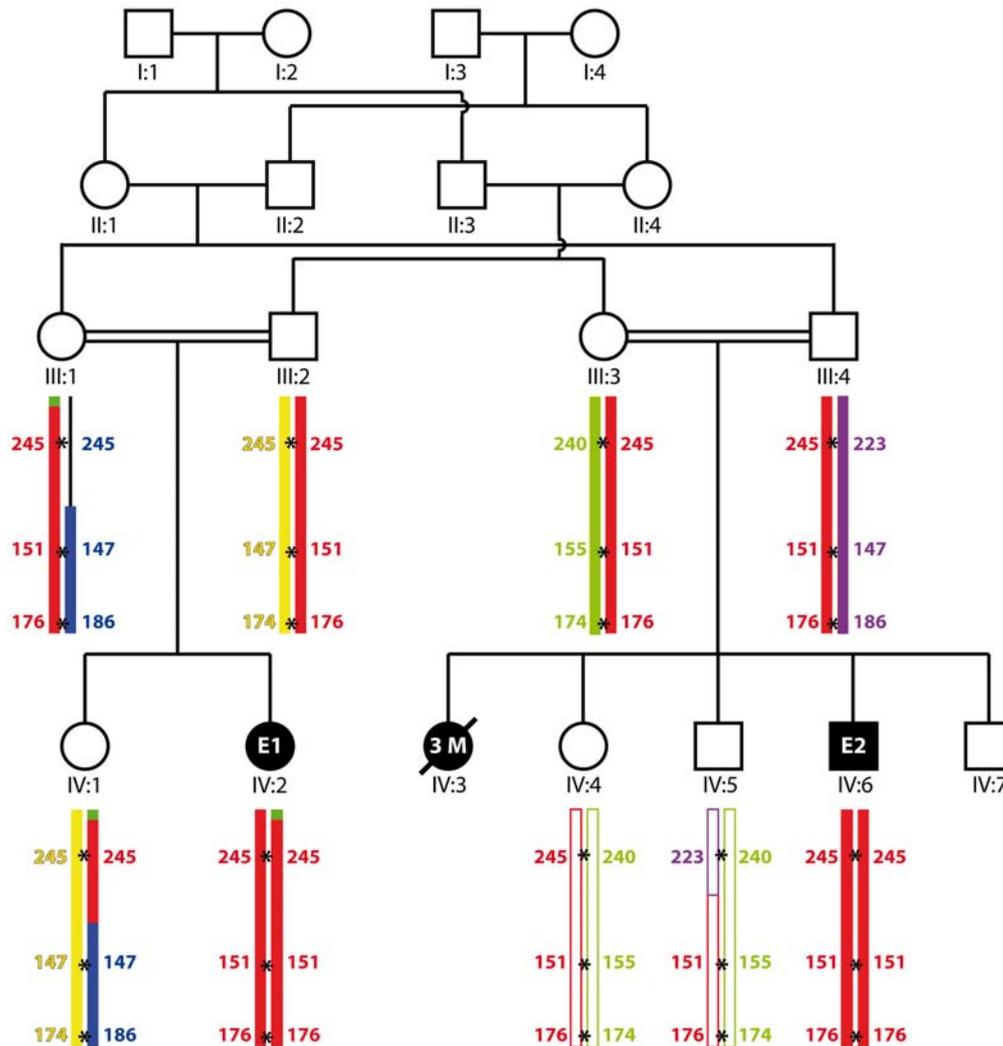


Abbildung 4: Haplotypanalyse der ägyptischen Familie und Segregation des Lokus 15q25.3-26.3.

Für die genomweite Kopplungsanalyse wurde die DNA beider Patienten, derer Eltern und der gesunden Schwester IV:1 analysiert. Der mutationsassoziierte Haplotyp ist rot dargestellt. Der Lokus wurde mittels dreier Marker bestätigt. Die Position der Marker ist durch die Sterne markiert und die Ergebnisse der Analyse seitlich eingetragen. Für die Kinder IV:4 und IV:5 wurde Lokus durch die Markeranalyse nachträglich rekonstruiert. Der zweite Bruder von E2 (IV:7) wurde erst nach abgeschlossener Analyse geboren und somit nicht typisiert.

Der Lokus 15q25.3–q26.3 (Abbildung 5) enthält ca. 80 Gene. Kandidaten wurden nach funktionellen Eigenschaften, Struktur und Expressionsmuster ausgewählt. Aufgrund bisheriger Publikationen wurden zuerst die Exone inklusive Exon-Intron-Grenzen der Gene *TTC23* (verschiedene TTC Proteine wurden bereits in Zusammenhang mit Zilien gebracht^{200,201}), *NTRK3* (Lokalisation in Gehirn und Niere²⁰², Hochregulation in Medulloblastomen²⁰³), and *RLBP1* (Mutationen in RLBP1 verursachen eine Variation von RP, genannt Bothnia Dystrophy²⁰⁴) mittels PCR-Amplifikation und nachfolgender Sequenzierung untersucht. In keinem der drei Gene konnte eine Mutation in der DNA der Patienten nachgewiesen werden.

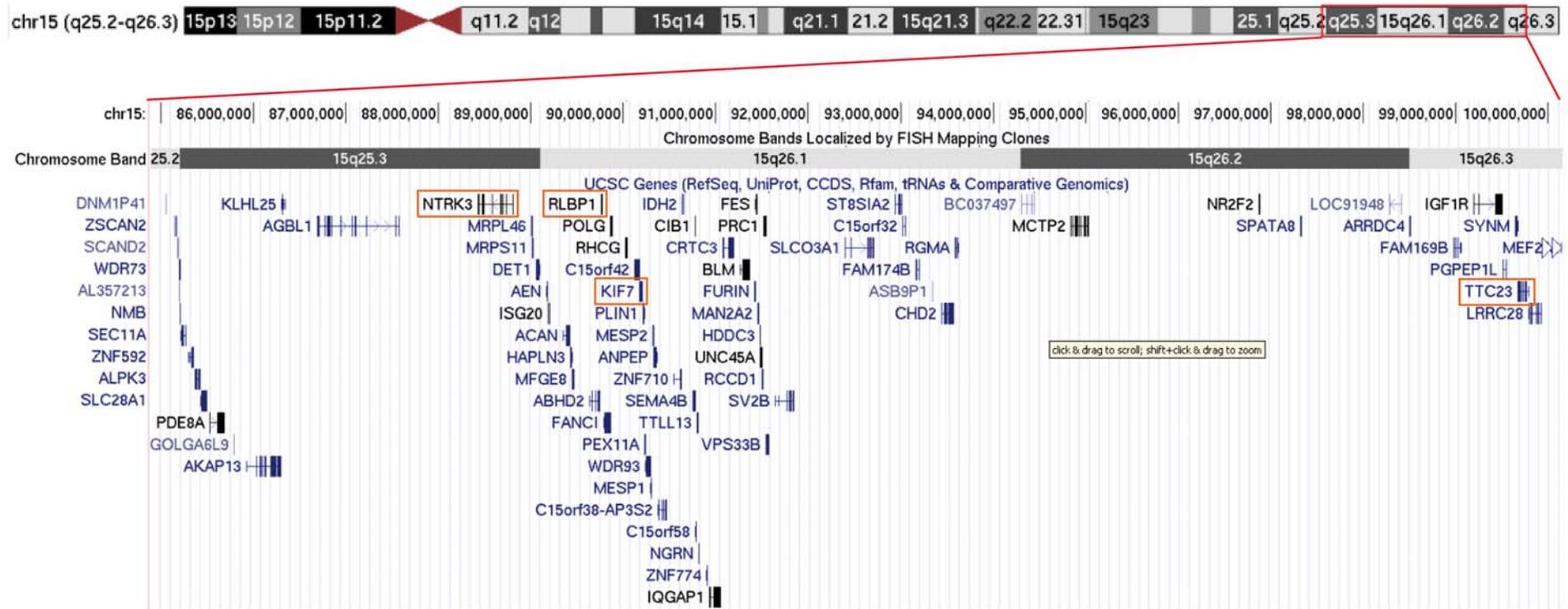


Abbildung 5: Kandidatengene im Lokus 15q25.3-26.3 (rote Box oben).

Der Lokus enthält ca. 80 annotierte Gene (dargestellt in blau und schwarz). Die Gene *NTRK3*, *RLBP1*, *TTC23* und *KIF7* (orangefarbene Boxen unten) wurden im Rahmen dieser Arbeit genotypisiert. (UCSC Genome Browser Human Assembly on Feb. 2009, hg19).

Ein weiteres Kandidatengen war *KIF7*, von dem bereits bekannt war, dass es an Zilien lokalisiert³⁰. Die Analyse der exonischen Sequenzen ergab eine homozygote 1 bp-Deletion (c.217delG) in Exon 1 von *KIF7* in beiden Patienten, die mit dem Phänotyp segregiert (Abbildung 6). Alle vier Elternteile weisen diese Mutation heterozygot auf, wohingegen die gesunden Geschwister das krankheitsverursachende Allel maximal im heterozygoten Status tragen. Diese Allelverteilung innerhalb der Familie korreliert mit der krankheitsverursachenden Rolle von *KIF7*. Die 1 bp-Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit schließlich durch einen frühzeitigen Stop bei der Translation des Proteins (p.A73PfsX109) zu einem trunkierten (verkürzten) Protein oder zu sogenanntem *nonsense-mediated decay*, also einem Abbau der Proteintrunkation. Es wurden keine Mutationen in einer Kontrollgruppe von 104 ägyptischen Personen gefunden.

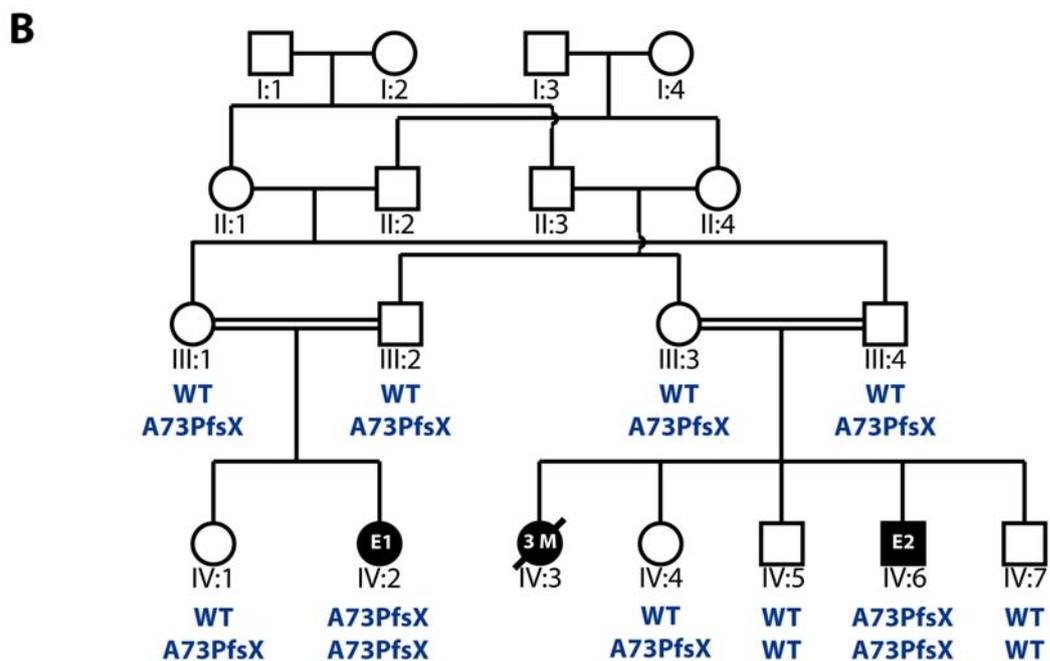
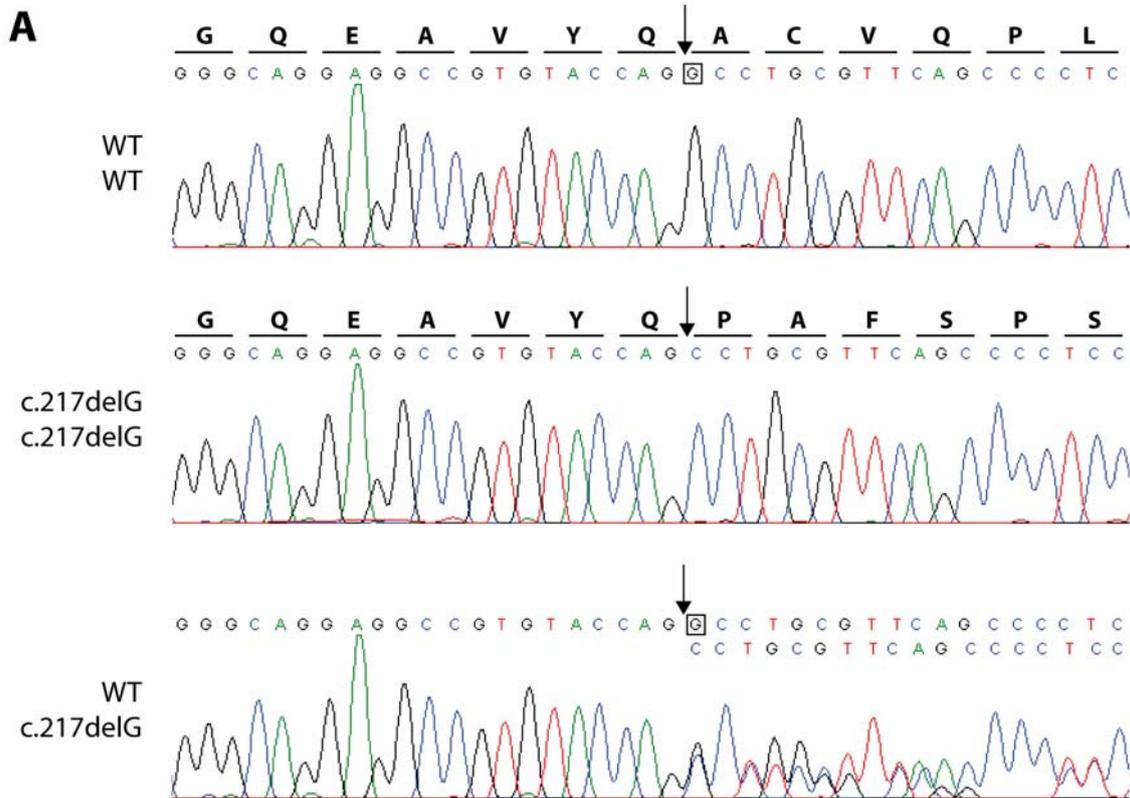


Abbildung 6: Mutation in *KIF7* und Allelverteilung innerhalb der Familie.

(A) Elektropherogramme der WT Sequenz der beiden Brüder von E2 (oben), der homozygoten 1 bp-Deletion in Exon 1 (c.217delG) in den beiden Patienten E1 und E2 (Mitte) und der heterozygoten Mutation in den sechs Trägern (unten). Das deletierte G ist mit einer schwarzen Box markiert. Durch die Deletion kommt es zur Verschiebung des Leserahmens und somit zu einem vorzeitigem Stop (A73PfsX). (B) Stammbaum der Familie mit eingetragener Allelverteilung der Mutation in *KIF7* (A73PfsX). Die Allele segregieren mit der krankheitsverursachenden Rolle von *KIF7*. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

Um weitere JBTS Patienten mit potentiellen Mutationen in *KIF7* zu finden, wurde das gesamte Kollektiv, aus dem diese Familie stammte (24 Patienten), untersucht (Dr. med. Solaf Mohamed Elsayed, Medical Genetics Center und Kinderklinik, Ain Shams Universität, Kairo, Ägypten). Außerdem wurden Proben aus einem Kollektiv mit 28 Patienten von Herrn Dr. med. Andreas Robert Janecke (Institut für Pädiatrie II, Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck, Österreich) und 27 Patientenproben von Herrn Dr. med. Yorck Hellenbroich (Institut für Humangenetik, Universitätsklinik von Schleswig-Holstein, Lübeck, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Insgesamt konnten zwei weitere Patienten mit je einer heterozygoten Mutation in *KIF7* gefunden werden (Abbildung 7). Ein deutscher männlicher Patient (G1) aus dem Innsbrucker Kollektiv trägt eine 1 bp-Deletion in Exon 3 (c.811delG), die ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem frühzeitigen Stop-Codon führt (p.E271RfsX51) (Abbildung 7A). Ein deutsches Mädchen (G2) aus dem Lübecker Kollektiv trägt eine heterozygote 12 bp-Deletion in Exon 18 (c.3986_3997del12), welche eine *in-frame* Deletion von vier Aminosäuren (p.R1329_S1332del) in der putativen Cargodomäne von *KIF7* verursacht (Abbildung 7B). Eine vorhergehende Schwangerschaft wurde aufgrund von Hydrozephalus und Enzephalozele in der 20. Schwangerschaftswoche abgebrochen (20W). Der Vergleich des C-Terminus von *KIF7* innerhalb verschiedener Säugetiere und Wirbeltiere zeigt, dass die Proteinregion der Cargodomäne hochkonserviert ist (Abbildung 7C). Auch für diese Mutationen wurden adäquate Kontrollkollektive (114 für c.811delG und 118 für c.3986_3997del12) getestet. In keiner Kontrolle konnten die Mutationen nachgewiesen werden.

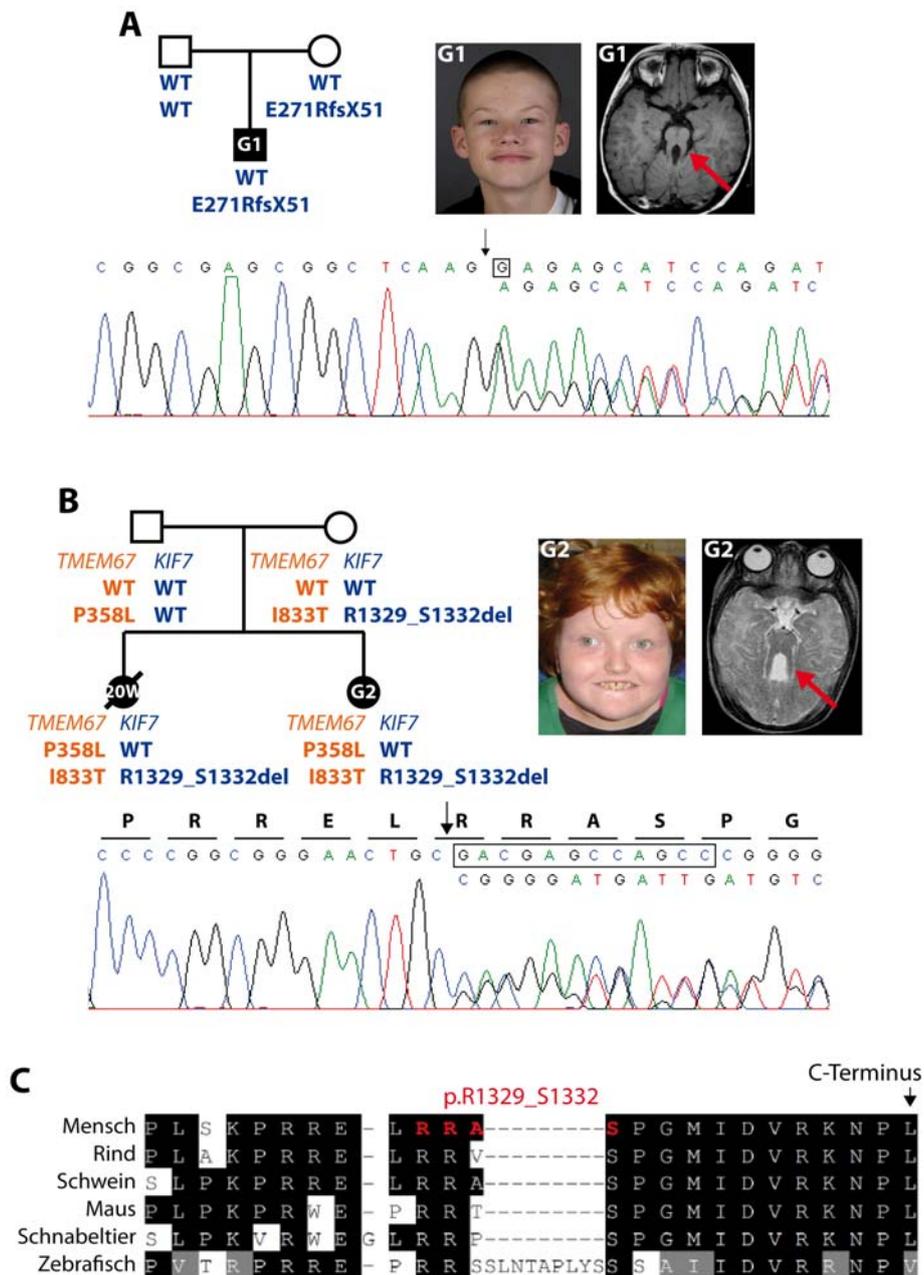


Abbildung 7: Screening nach weiteren JBTS Patienten mit *KIF7* Mutationen.

(A) Stammbaum, Symptome und Allelverteilung einer deutschen Familie mit einem männlichen JBTS Patienten (G1). Das Elektropherogramm zeigt eine heterozygote 1 bp-Deletion in Exon 3 (c.811delG), welche von der Mutter übertragen worden ist. Diese Deletion führt zur Verschiebung des Leserahmens und einem vorzeitigen Stop (E271RfsX51). Die klinische Diagnose von Patient G1 wurde von Dr. med. Andreas Robert Janecke erstellt. (B) Eine weitere deutsche Familie mit einer Tochter mit JBTS (G2). Eine vorhergehende Schwangerschaft wurde aufgrund einer Enzephalozele mit Hydrozephalus in der 20. Schwangerschaftswoche abgebrochen (20W). Sowohl die Patientin als auch der Fötus weisen zwei *compound* heterozygote Mutationen in dem bekannten JBTS Gen *TMEM67* auf. Das Elektropherogramm zeigt die 12 bp-Deletion am 3'-Ende des Exons 18 von *KIF7*, welche zu einer *in-frame* Deletion von vier Aminosäuren führt (R1329_S1332del). Die klinische Diagnose von Patient G2 wurde von Dr. med. Yorck Hellenbroich erstellt. (C) Wie der Vergleich der Proteinsequenz zeigt, sind die vier deletierten Aminosäuren in G2 innerhalb der Wirbeltiere stark konserviert. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

Da in beiden Patienten G1 und G2 keine homozygoten oder compound heterozygoten Mutationen in *KIF7* durch die Sequenzierung der Exone gefunden werden konnte, wurde ein *array comparative genomic hybridization* (CGH) auf einem hochauflösenden 385K NimbleGen (Roche) *array* durchgeführt. Dabei wurden Oligomersonden (50mere bis 70mere, im Abstand von ~20 bp) verwendet, die den *KIF7* Locus sehr kompakt abdecken. Zudem deckte ein genomweiter CGH Array (Affymetrix 6.0 SNP array) über 906.000 SNPs und über 946.000 *copy number variations* (CNV, Variationen in der Kopienzahl) mittels Sonden ab (Daten nicht gezeigt). Die Daten wurden mit Hilfe von GTC und HapMap quantitativ analysiert. Es zeigten sich in beiden Patienten keine strukturellen Veränderungen in unmittelbarer Nähe oder im *KIF7* Locus. Auch eine relativ häufige mit JSRD in Verbindung stehende Deletion in *NPHP1*⁶ wurde nicht gefunden. Genomweit wurden keine weiteren Auffälligkeiten gefunden.

Die Sequenzierung aller bekannten autosomalen JBTS Gene offenbarte zwei *compound* heterozygote Mutationen in *TMEM67* (p.P358L und p.I833T) in der Patientin G2. Der Patient G1 zeigte keine weiteren Mutationen in einem bekannten JBTS Gen mit autosomal-rezessivem Vererbungsmodus.

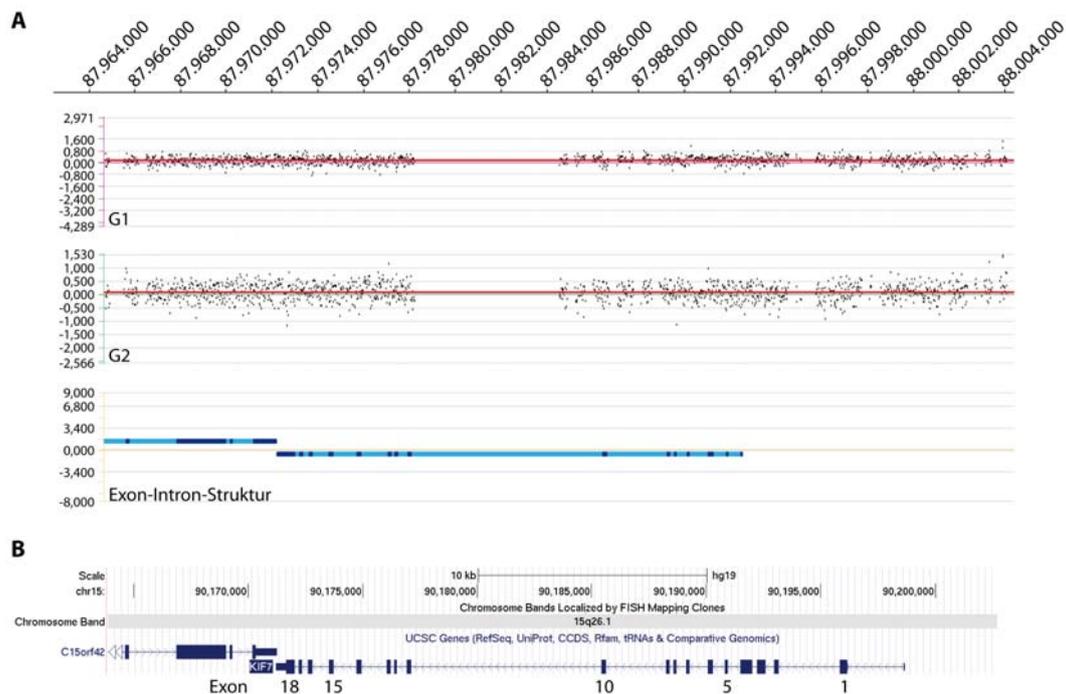


Abbildung 8: Ausschluss von Exondeletionen in den Patienten G1 und G2.

(A) Große Deletionen oder Duplikationen in kodierenden Regionen von *KIF7* wurden durch einen hochauflösenden array CGH mit Hilfe eines kundenspezifischen NimbleGen array ausgeschlossen. Die schwarzen Punkte kennzeichnen die Oligonukleotid-Sonden, die die genomische Region von *KIF7* abdecken. (B) Auszug vom UCSC Genome Browser Human Assembly on Feb. 2009 (hg19) für die entsprechende Region. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

Ein mittels RT-PCR erstelltes semi-quantitatives Expressionsprofil von *KIF7* in verschiedenen humanen und murinen Geweben zeigte, dass *KIF7* in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert ist (Abbildung 9). In Übereinstimmung mit *in situ* Hybridisierungsdaten (online verfügbar unter <http://mouse.brain-map.org>) aus der Maus zeigt vor allem das Cerebellum eine starke Expression.

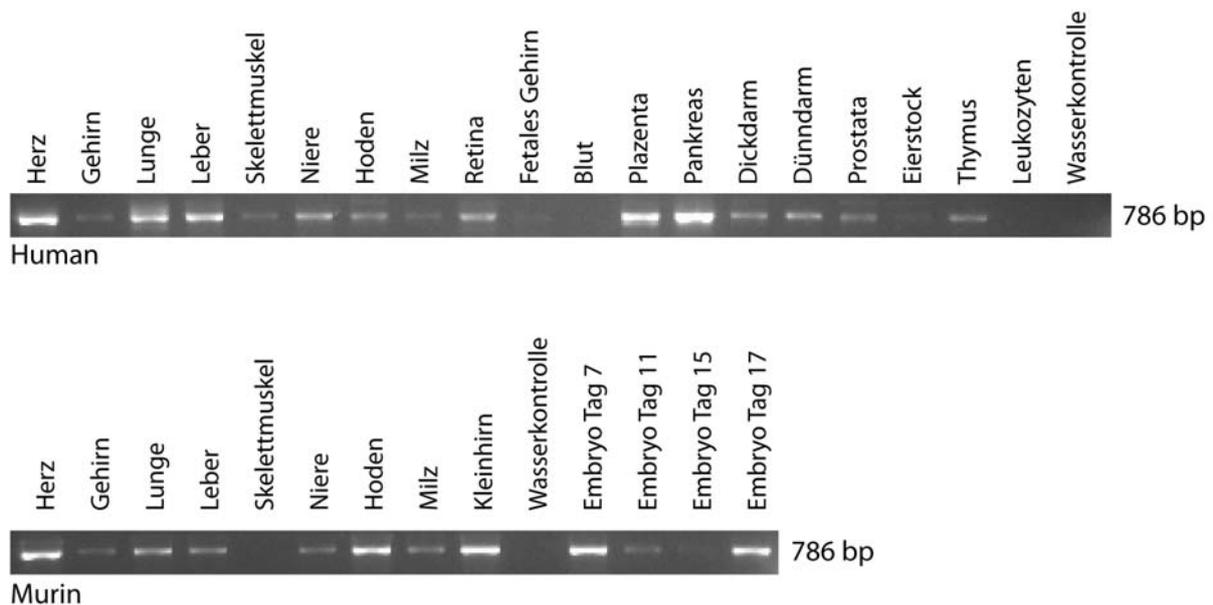


Abbildung 9: Expressionsprofil von humanem und murinem *KIF7*.

Mittels Intron-überspannenden cDNA-Primern wurde die Expression von *KIF7* in verschiedenen humanen und murinen Geweben semi-quantitativ untersucht. *KIF7* ist in beiden Species stark im Herz exprimiert. Des Weiteren ist *KIF7* in anderen humanen Geweben wie Lunge, Leber, Plazenta und Pankreas nachweisbar. In der Maus zeigt sich eine verstärkte Expression in den Hoden, im Kleinhirn und in den Gesamtembryonen der Stadien Tag 7 und Tag 17. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

5.2 Lokalisation von KIF7

Um die genaue Lokalisation von endogenem KIF7 zu untersuchen, wurden Flp-In NIH-3T3 Zellen benutzt. Diese Zelllinie enthält eine Einzelkopie einer FRT (*Flp-recombinase target*)-Integrationsstelle, so dass mit Hilfe der Rekombinase Flippase (Flp) ein beliebiges Gen (*gene of interest*, GOI) als Einzelkopie in des Genom rekombiniert werden kann. Dadurch wird ein endogenes Expressionsniveau simuliert. Zur Selektion der FRT-Kassette enthielt diese das Zeocin-Resistenzgen. Etwa eine Passage vor der Transfektion der Plasmide wurde die Zeocin-Selektion abgesetzt.

Zur Etablierung der Methode wurde zuerst GFP in den pgLAP5 Vektor kloniert und Flp-In NIH-3T3 Zellen mit diesem Plasmid und einem für die Flippase kodierenden Plasmid (pOG44), mittels Lipofektion transfiziert. Nach ca. zweiwöchiger Selektion mit Hygromycin B (200 µg/ml) waren alle nicht rekombinierten Zellen abgestorben. Zellen, die erfolgreich rekombiniert haben, waren resistent und zeigten unter Hygromycin B Selektion ein normales weiteres Wachstum. Alle resistenten Zellen zeigen eine relativ schwache, aber gleichmäßige GFP-Expression (Abbildung 10A).

Um Flp-In NIH-3T3 Zellen zugenerieren, die stabil C-terminal GFP-getaggt KIF7 exprimieren, wurde KIF7 FL in den pgLAP5 (enthält GFP C-terminal vom GOI) kloniert. Dazu wurde zuerst *KIF7* (ohne Stop-Codon) via PCR-Amplifikation in den pENTR Vektor und dann mittels LR-Rekombination in den pgLAP5 kloniert. Um nachzuweisen, dass die Zellen nach erfolgreicher Hygromycin B Selektion das gewünschte Konstrukt enthalten, wurden zwei unterschiedliche Wege (auf mRNA-Ebene (1) und auf Proteinebene (2)) gewählt. (1) Von untransfizierten (Flp-In NIH-3T3) und transfizierten (NIH KIF7-GFP) Zellen wurde RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit zwei verschiedenen cDNA-Primerpaaren (KIF7-c.11F + KIF7-c.15R (818 bp) und KIF7-c.14/15F + KIF7-c.18R (786 bp)) auf der cDNA eine PCR durchgeführt und die Fragmente auf einem 2%-igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Da die Flp-In NIH-3T3 Zellen murinen Ursprungs und die integrierte kodierende Sequenz von *KIF7* und die cDNA-Primer humanen Ursprungs sind, erhielt man in der Negativkontrolle (Flp-In NIH-3T3) keine Bande, während die NIH KIF7-GFP Zellen die gewünschten Fragmente zeigten (Abbildung 10B). (2) Um das Fusionskonstrukt auf Proteinebene zu zeigen, wurden *whole cell lysates* gewonnen und die Proteine in einer SDS-PAGE separiert. Die Membran wurde gegen GFP gefärbt und somit das Fusionsprotein KIF7-GFP nachgewiesen (Abbildung 10C).

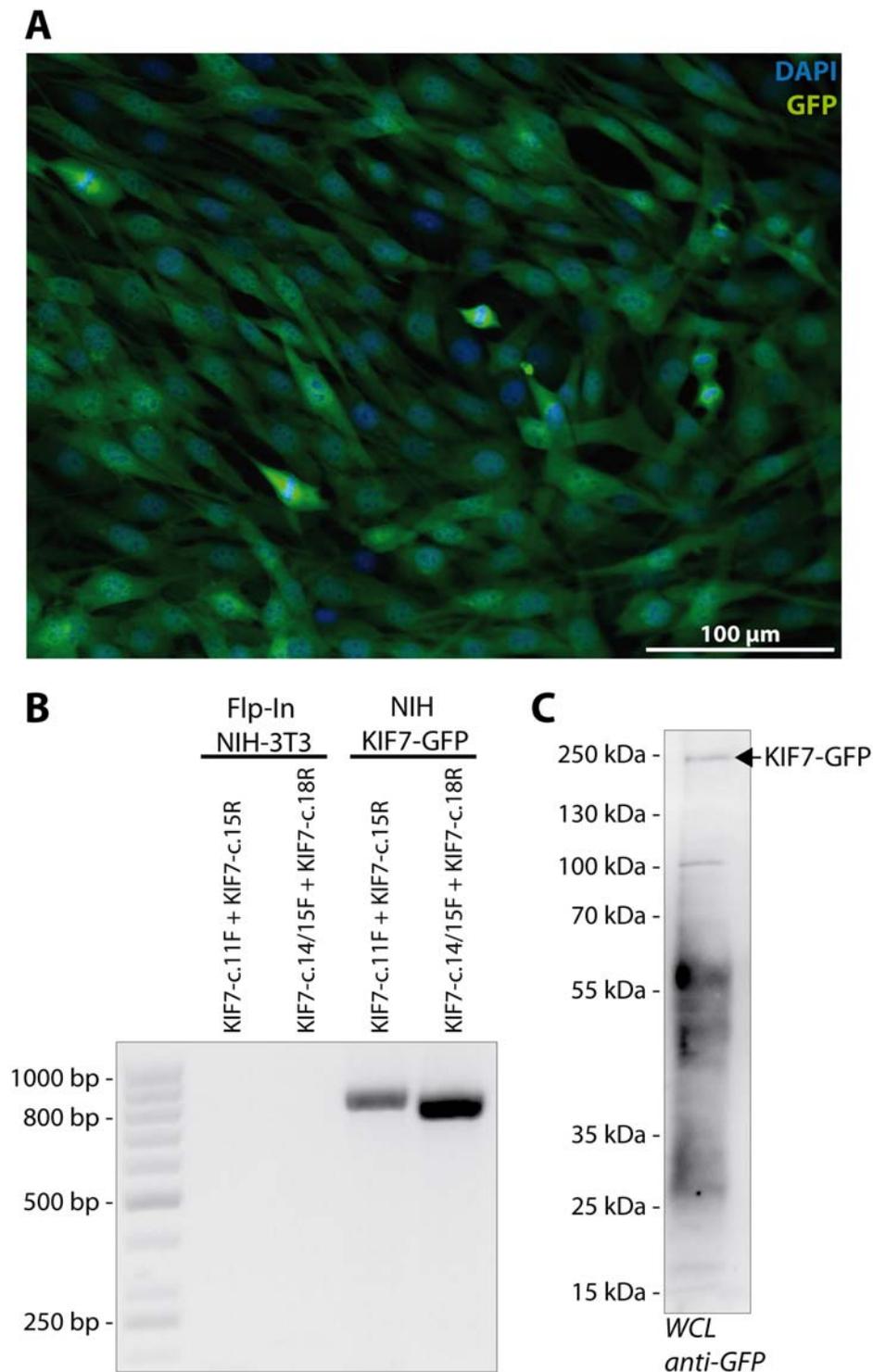


Abbildung 10: Etablierung der Flp-In Methode und Nachweis der Expression von KIF7-GFP.

(A) Um die Flp-In Methode zu etablieren wurden Flp-In NIH-3T3 Zellen mit GFP (in pgLAP5) mittels Lipofektion transfiziert. Nach erfolgreicher Selektion mit Hygromycin B zeigten alle Zellen eine gleichmäßige GFP-Expression. (B+C) Nachweis der Expression von KIF7-GFP in transfizierten Zellen. (B) Aus untransfizierten Flp-In NIH-3T3 und transfizierten (NIH KIF7-GFP) Zellen wurde cDNA hergestellt und diese als Template für eine PCR mit humanen *KIF7* cDNA Primern benutzt. Nur die transfizierten Zellen zeigen das gewünschte Fragment. (C) Mittels SDS-PAGE konnte das Fusionsprotein KIF7-GFP mittels WB-Analyse nachgewiesen werden.

Die NIH KIF7-GFP Zellen wurden weiterhin in Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. KIF7 ist im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und zeigt ein mikrotubuli-ähnliches Muster. In nicht-zilierten Zellen ist KIF7 im Bereich des Zentrosoms konzentriert (gezeigt in Co-Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Zentrosomen-Marker Pericentrin) (Abbildung 11).

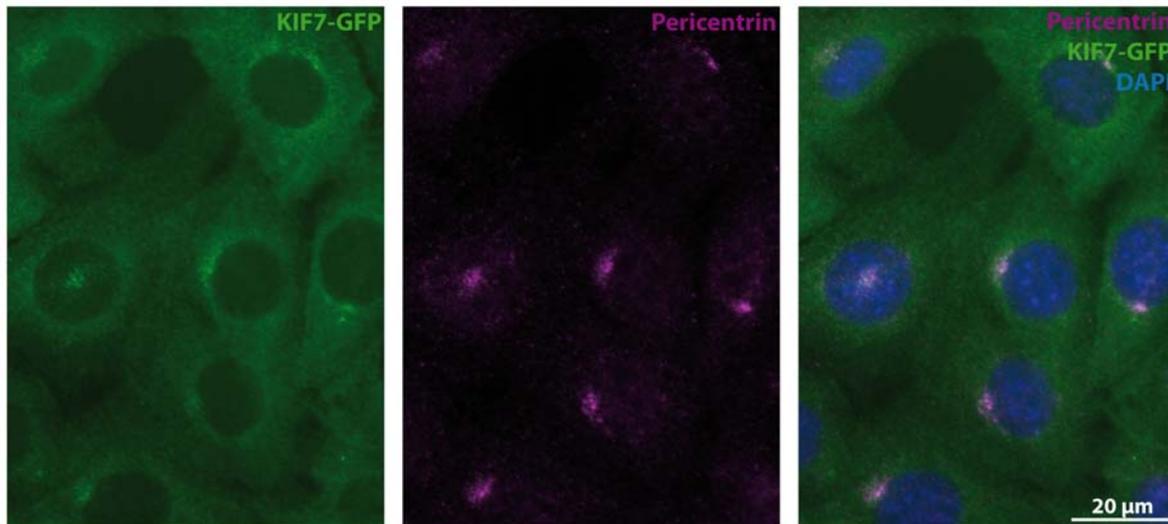


Abbildung 11: KIF7 lokalisiert am Zentrosom in nicht-zilierten Zellen.

NIH-3T3 KIF7-GFP Zellen wurden in 4% PFA fixiert und gegen den Zentrosomen-Marker Pericentrin (magenta) und DAPI (blau) gefärbt.

In zilierten Zellen hingegen ist KIF7 zusätzlich zu der zentrosomalen Lokalisation an der Spitze des Ziliums lokalisiert (Abbildung 12).

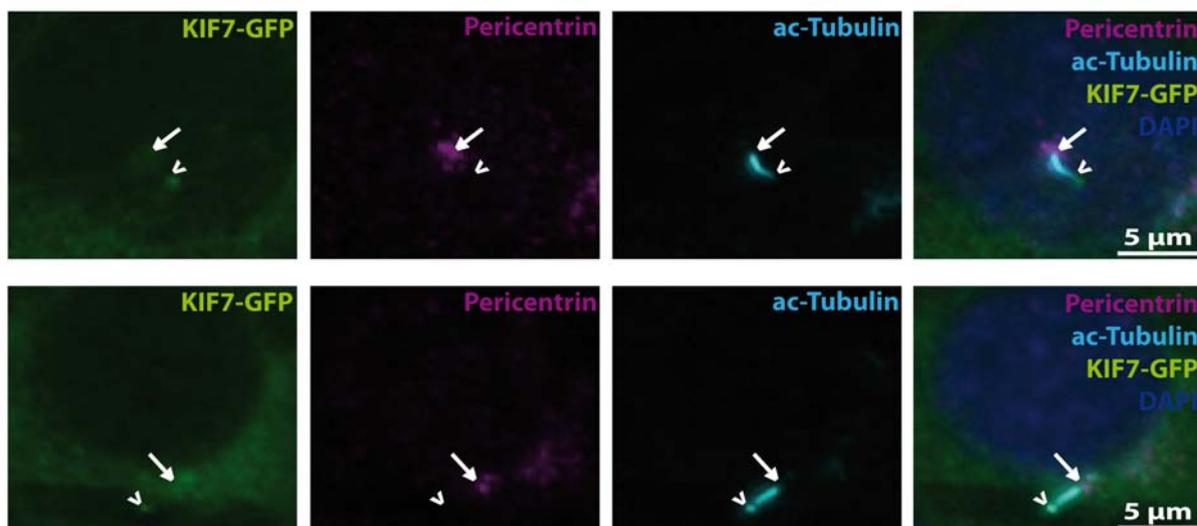


Abbildung 12: In zilierten Zellen lokalisiert KIF7 am Zentrosom und an der Spitze des Ziliums.

NIH- KIF7-GFP Zellen wurden in 4% PFA fixiert und gegen Pericentrin (magenta), acetyliertes Tubulin (hellblau) und DAPI (blau) gefärbt.

Bei genauerer Betrachtung der ziliären KIF7 Lokalisation findet man unterschiedliche Lokalisationsmuster in verschiedenen Zellen: (i) nur an der Spitze des Ziliums (Abbildung 13B), (ii) verteilt entlang des gesamten Ziliums (Abbildung 13C), (iii) sowohl an der Basis als auch an der Spitze des Ziliums (Abbildung 13D) und (iv) punktuell an der Spitze des Ziliums und kreisförmig an der Zilienbasis (Abbildung 13E).

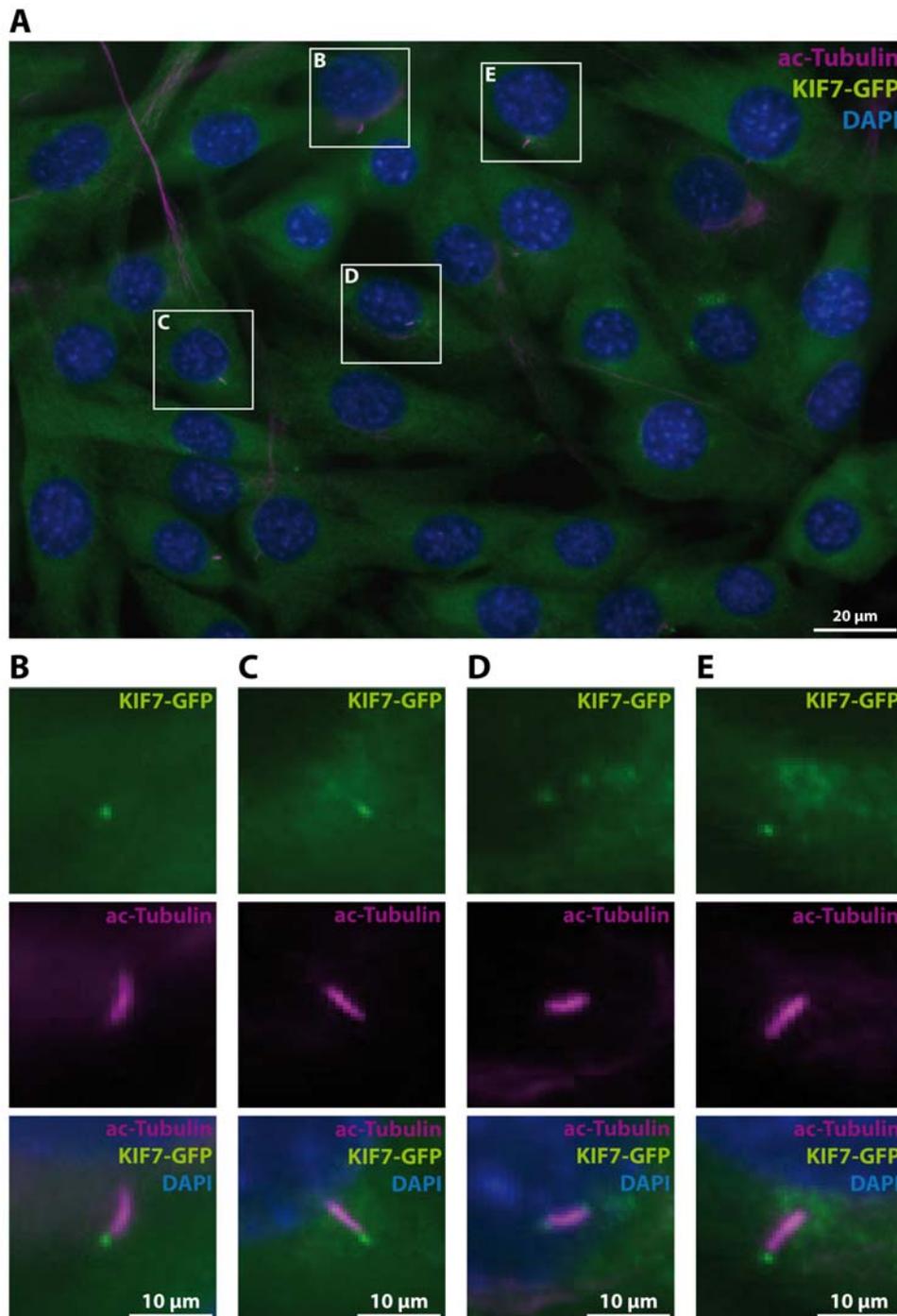


Abbildung 13: KIF7 zeigt unterschiedliche Lokalisationen innerhalb des Ziliums.

NIH KIF7-GFP Zellen wurden fixiert und gegen den Zilien-Marker acetyliertes Tubulin (magenta) und DAPI (blau) gefärbt. (A) Übersichtsbild. (B-E) Vergrößerte Einzelzilien aus (A).

5.3 Validierung einer siRNA zur negativen Regulation der *KIF7* Expression

Zur funktionellen Aufarbeitung der zellulären *KIF7*-Bedeutung wurden *small interfering RNAs* (siRNAs) etabliert, die die *KIF7*-Expression negativ regulieren. Die *knockdown*-Effizienz der *KIF7* siRNA#1 wurde zunächst in einem Luciferase Assay ermittelt. Da diese siRNA gegen die 3'UTR von *KIF7* gerichtet ist, wurde diese in einen psiCHECK2TM Vektor kloniert. Die Expression der fusionierten Renilla mRNA wird somit in diesem Vektor durch die *KIF7* 3'UTR translational reguliert. Die unabhängige und nicht regulierte Expression einer gleichzeitig auf dem Vektor kodierten mRNA für eine Firefly Luciferase dient als Transfektionskontrolle. Als Negativkontrolle wurde eine unspezifische siRNA (co siRNA), als Positivkontrolle eine siRNA, die direkt gegen Renilla (Renilla siRNA) gerichtet ist, verwendet. Um sicherzugehen, dass die *KIF7* siRNA#1 spezifisch an die 3'UTR bindet und nicht an einen anderen Teil des Konstrukts z.B. an Renilla, wurde der Versuch zusätzlich mit einem psiCHECK2TM Vector ohne *KIF7* 3'UTR durchgeführt. In diesem Experiment erreichte die *KIF7* siRNA#1 eine *knockdown*-Effizienz von ~75% (Abbildung 14A).

Um unspezifische Effekte dieser siRNA auszuschließen, wurde eine weitere *KIF7* siRNA etabliert. RPE-1 bzw. U2OS Zellen wurden mit co siRNA, *KIF7* siRNA#1 oder *KIF7* siRNA#2 transfiziert. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Beide *KIF7* siRNAs wurden mittels qRT-PCR validiert. Dabei konnte die relative *KIF7* mRNA Expression der *knockdown* Zellen ermittelt werden. Während sich die *knockdown*-Effizienz der *KIF7* siRNA#1 hier bestätigte (~70%), erreichte die *KIF7* siRNA#2 ~50% (Abbildung 14B+C).

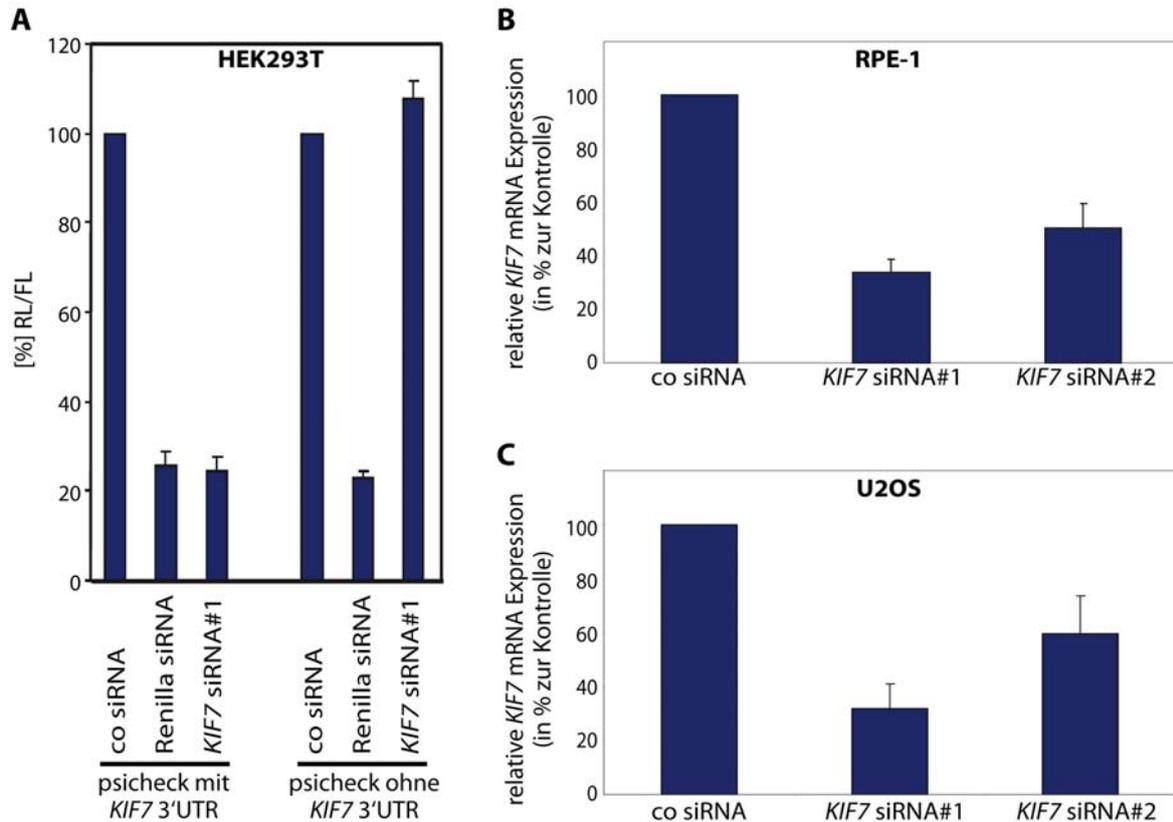


Abbildung 14: Validierung der KIF7 siRNAs in HEK293T, RPE-1 und U2OS Zellen.

(A) Luciferase Assay zur Validierung der KIF7 siRNA#1. HEK293T Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs und Plasmiden transfiziert. Die KIF7 siRNA#1 erreicht eine spezifische *knockdown*-Effizienz von ~75% (n=3). (B) Validierung der *knockdown*-Effizienz beider KIF7 siRNAs (#1 und #2) in RPE-1 Zellen mittels qRT-PCR. Die KIF7 siRNA#1 bestätigt die Effizienz von ~75%, wohingegen die KIF7 siRNA#2 eine ~50%-ige Effizienz zeigt (n=4). (C) Validierung der *knockdown*-Effizienz beider KIF7 siRNAs (#1 und #2) in U2OS Zellen mittels qRT-PCR. Die *knockdown*-Effizienzen beider KIF7 siRNAs zeigen ähnliche Werte wie in RPE-1 Zellen (n=3). (A-C) Die Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler an. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

5.4 KIF7 interagiert mit dem JBTS4 Protein NPHP1

Es wurde weiterhin überprüft, ob KIF7 mit bereits bekannten JBTS Proteinen interagiert. Hierfür wurden KIF7 und das JBTS4 Protein NPHP1, bzw. KIF7-Trunkationen in HEK293T Zellen exprimiert. In verschiedenen Co-IP Experimenten konnte gezeigt werden, dass KIF7 in der Lage ist, NPHP1 zu präzipitieren, und *vice versa*. Durch Versuche mit verschiedenen Trunkationen von KIF7, konnte die NPHP1-präzipitierende Region in KIF7 auf die Aminosäuren 513-775 kartiert werden. Auch in einer semiendogenen IP konnte endogenes NPHP1 überexprimiertes KIF7 co-präzipitieren (Abbildung 15A-E).

Um zu testen, ob KIF7 die zelluläre Lokalisation von NPHP1 beeinflusst, wurde der Effekt eines *KIF7 knockdowns* auf die Lokalisation von NPHP1 in RPE-1 Zellen untersucht. Dazu wurden RPE Zellen mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert und IF-Färbungen gegen NPHP1 angefertigt. NPHP1 ist in WT RPE-1 Zellen am Zentrosom und am Golgi Apparat lokalisiert. Interessanterweise führte der *knockdown* von *KIF7* zu einer veränderten Darstellung der NPHP1 Lokalisation. Aufgrund der Ergebnisse der nachfolgenden Versuche gehen wir davon aus, dass dieser veränderten Darstellung der Verlust der regulären Struktur und eine Fragmentierung des Golgi Apparates zu Grunde lag, die sich bereits in den Versuchen zur NPHP1-Lokalisation mit einem veränderten Signal des Golgi-Markers Golgin97 zeigte (Abbildung 15F).

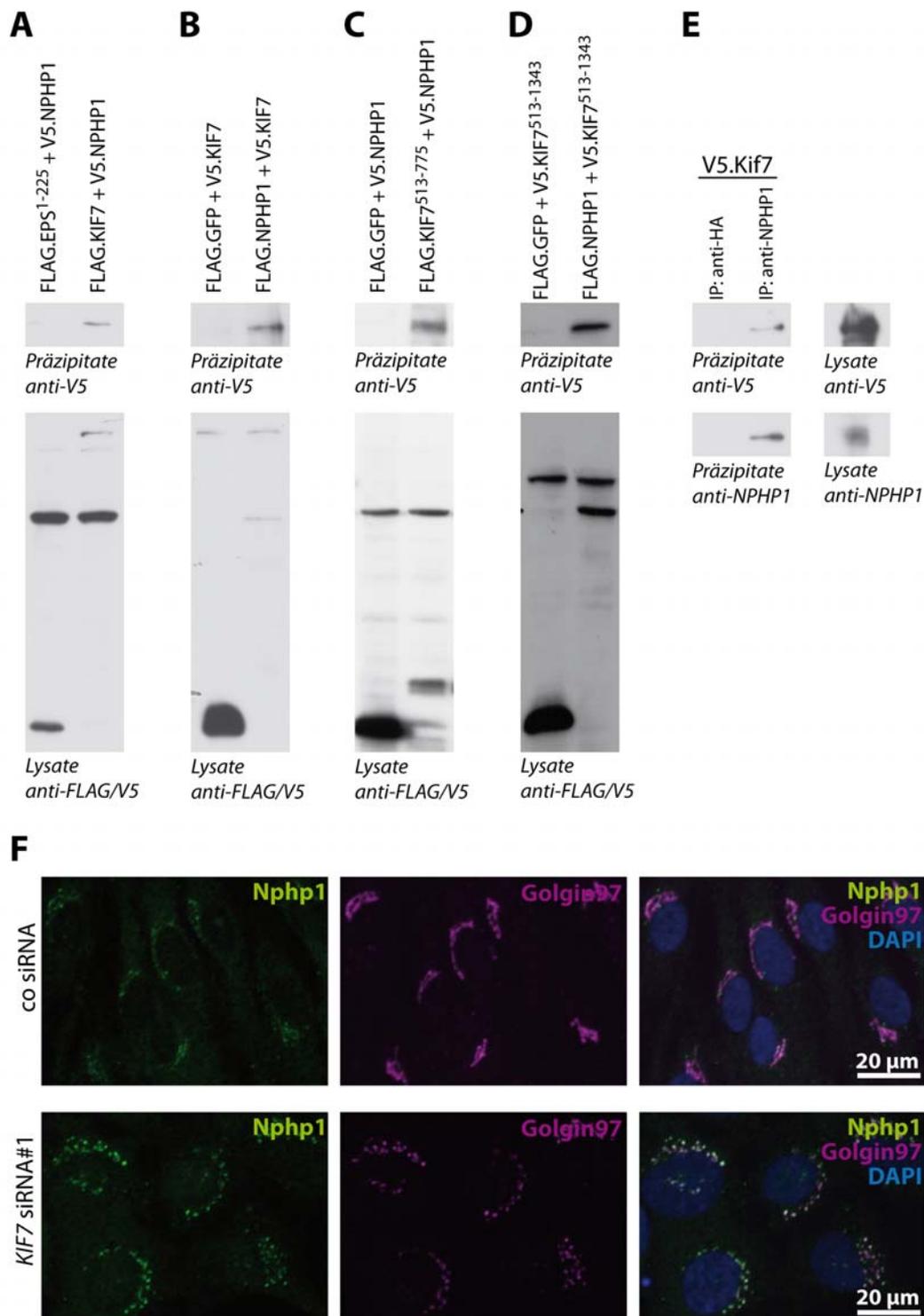


Abbildung 15: KIF7 interagiert mit dem bekannten JBTS Protein NPHP1.

(A+B) In Co-IP Experimenten präzipitiert KIF7 FL NPHP1 FL und *vice versa*. (C) Die Aminosäurereste 513-775 von KIF7 waren ausreichend, um NPHP1 zu präzipitieren. (D) NPHP1 präzipitiert die C-terminale Trunkation KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³. (E) In einer semi-endogenen IP war endogenes NPHP1 in der Lage, überexprimiertes KIF7 zu präzipitieren. (F) Immunfluoreszenzfärbung von RPE-1 Zellen nach Transfektion mit co siRNA oder KIF7 siRNA#1. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und gegen NPHP1 (grün), Golgin97 (magenta) und DAPI (blau) gefärbt. Der *knockdown* von KIF7 führt zu einer Veränderung des NPHP1 Signals, die vermutlich durch eine Fragmentierung des Golgi Apparats verursacht wird. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

5.5 *Knockdown* von *KIF7* in Zellkultur führt zu Strukturveränderungen in verschiedenen Zellorganellen

5.5.1 Fragmentierung des Golgi Apparates

Zur Klärung des pathophysiologischen Mechanismus, den der Verlust von *KIF7* in der Zelle nach sich zieht, wurden weitere *knockdown* Versuche in Zellkultur durchgeführt. Hierfür wurden wieder RPE-1 Zellen mit *KIF7* siRNA#1 transfiziert und verschiedene Organellen (Golgi, Zilien, Zentrosomen) analysiert. Wie bereits die veränderte Darstellung von NPHP1 in *KIF7 knockdown* Zellen vermuten ließ, zeigte die Färbung mit dem Golgi Marker Golgin97 eine ausgedehnte Fragmentierung des Golgi Apparats. Im Gegensatz dazu war der Golgi Apparat in Kontrollzellen im bekannten zusammenhängenden perinuklären Netzwerk angeordnet (Abbildung 16A). Dieser Befund aus Immunfluoreszenzfärbungen wurde auch in einer Kooperation mit Herrn Dr. med. Klaus Addicks (Institut für Anatomie, Klinik der Universität zu Köln, Köln, Deutschland) mittels Elektronenmikroskopbildern (Abbildung 16B) bestätigt. Die Transfektion einer zweiten *KIF7* siRNA (*KIF7* siRNA#2), die gegen die kodierende Sequenz von *KIF7* gerichtet ist, zeigte eine leicht abgeschwächte Fragmentierung des Golgi Apparats (Abbildung 16C).

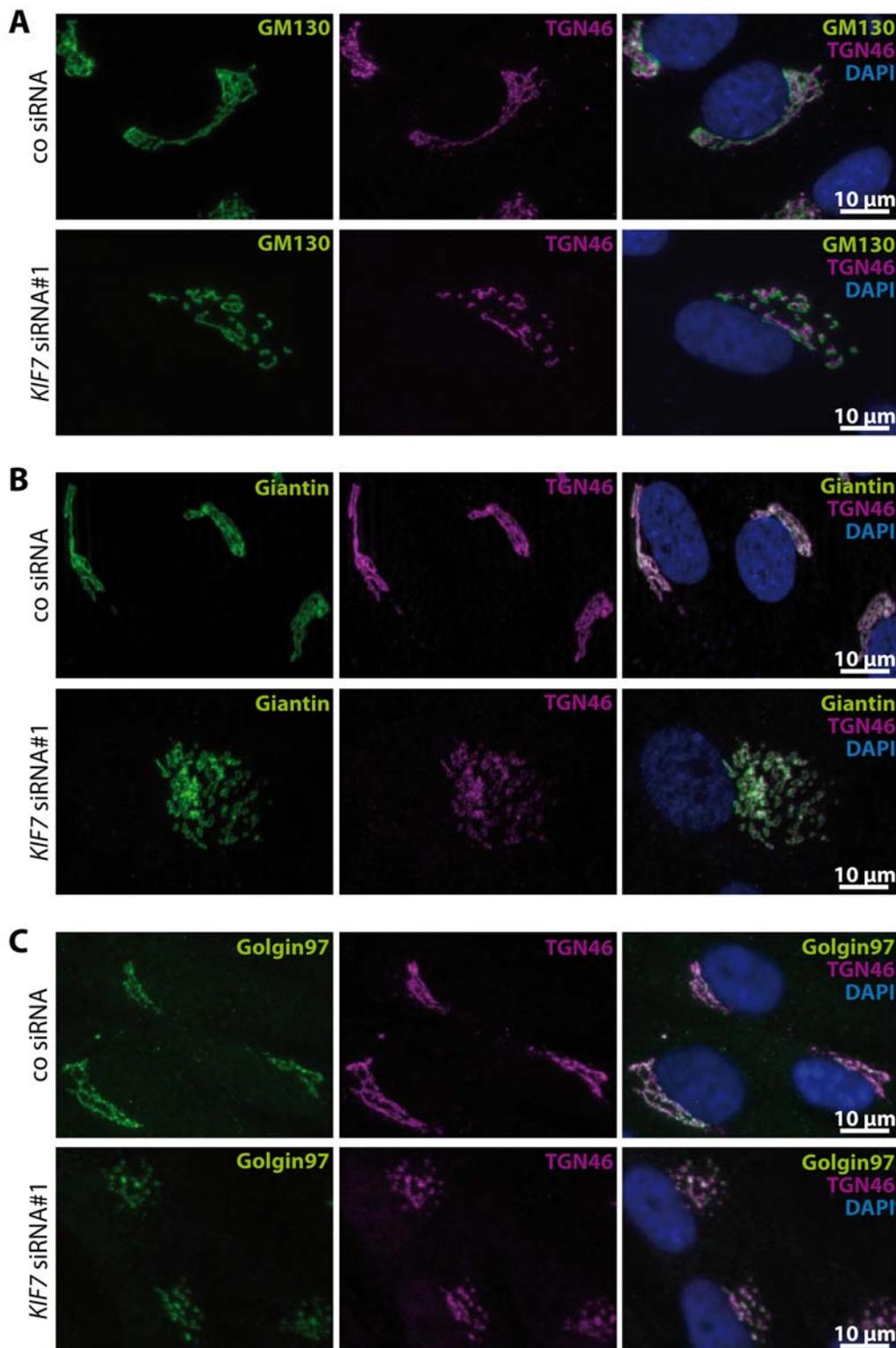


Abbildung 17: Der *knockdown* von *KIF7* beeinträchtigt alle drei Kompartimente des Golgi Apparats.

RPE-1 Zellen wurden mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert und nach 48 h mit verschiedenen Markern gegen die unterschiedlichen Teile des Golgi Apparats und DAPI (blau) gefärbt. Der *KIF7 knockdown* beeinträchtigt alle Golgi Netzwerke. **(A)** GM130 (Cis-Golgi, grün) und TGN46 (Trans-Golgi, magenta). **(B)** Giantin (Medial-Golgi, grün) und TGN46 (Trans-Golgi, magenta). **(C)** Golgin97 (Trans-Golgi, grün) und TGN46 (Trans-Golgi, magenta). Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

Um die Spezifität des Effekts zu bestätigen, wurden *Rescue*-Untersuchungen durchgeführt. Für diese *rescue*-Versuche wurden RPE-1 Zellen 24 h nach der Transfektion mit siRNA (co siRNA oder *KIF7* siRNA#1) zusätzlich mit Protein-kodierenden Plasmiden transfiziert (V5.EPS¹⁻²²⁵, V5.KIF7 FL oder V5.KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³). Die Expression der Kontrolle V5.EPS¹⁻²²⁵ zeigte keine Veränderung der Golgi Struktur (Abbildung 18A). Die Transfektion einer *KIF7* FL kodierenden cDNA-Sequenz, die aufgrund der fehlenden 3'UTR für die *KIF7* siRNA#1 nicht sensitiv war, hingegen konnte den massiven Fragmentierungsphänotyp des Golgi Apparats teilweise wieder aufheben (Abbildung 18B). Parallel wurde eine Trunktion von *KIF7* transfiziert, der die N-terminale Motordomäne des Kinesins *KIF7* fehlt (V5.KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³). Interessanterweise führte die Expression dieser Trunktion nicht zu einer Abschwächung des Golgi Phänotyps. Vielmehr zeigten exprimierende Kontrollzellen (co siRNA) nach Transfektion von V5.Kif7⁵¹³⁻¹³⁴³ eine verstärkte Zerstreung des Golgi Apparats und Zellen mit Expression der Trunktion nach *KIF7* knockdown zeigten einen massiveren Phänotyp im Vergleich zum alleinigen *KIF7* knockdown (Abbildung 18C). Die C-terminale *KIF7* Trunktion zeigte somit eine dominant-negative Wirkung auf den Phänotyp des Golgi Apparats.

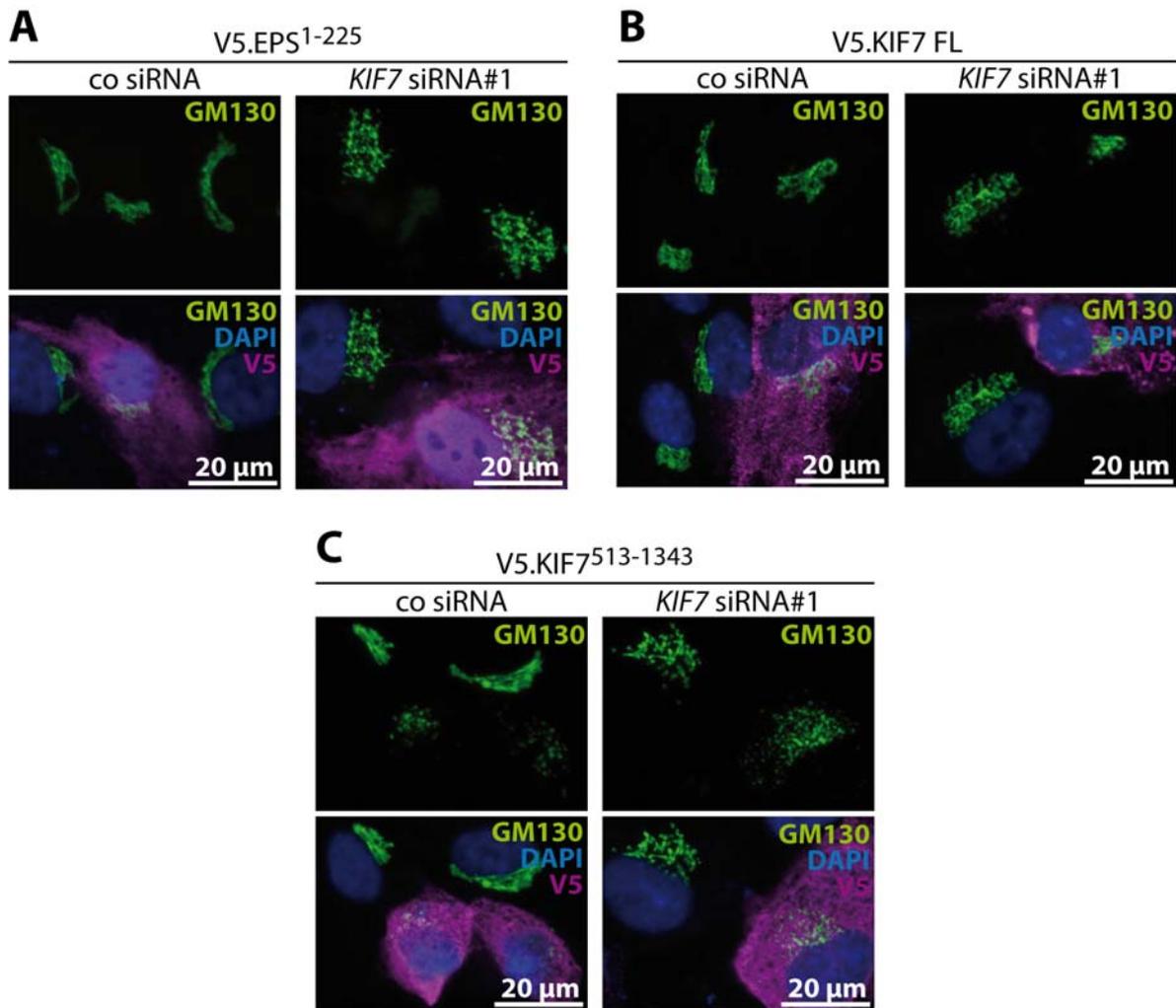


Abbildung 18: Überexpression von KIF7 FL verhindert den *KIF7 knockdown* Effekt auf den Golgi Apparat in RPE-1 Zellen.

RPE-1 Zellen wurden mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert. Nach 24 h wurden V5.EPS¹⁻²²⁵, V5.KIF7 FL oder V5.KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³ co-transfiziert. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen das V5-tag (magenta), GM130 (grün) und DAPI (blau) in einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht. (A) Überexpression des Kontrollproteins V5.EPS¹⁻²²⁵ zeigt keine Auswirkungen auf die Struktur des Golgi Apparats. (B) Die Überexpression von V5.KIF7 FL war in der Lage den Phänotyp einer Fragmentierung des Golgi Apparats rückgängig zu machen. (C) Die Expression einer C-terminalen KIF7 Trunkation (V5.KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³), der die N-terminale KIF7 Motordomäne fehlt, führt zu einem *knockdown*-ähnlichen Phänotyp. Der Golgi Apparat von Zellen, die diese C-terminale Trunkation exprimieren, fragmentiert noch stärker als in alleinigen *knockdown* Versuchen. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

Nach der Darstellung der strukturellen Veränderungen des Golgi Apparats wurde mittels eines VSV-G Assays die Funktionsfähigkeit des Golgi Apparats analysiert. Hierfür bedienten wir uns eines plasmid-kodierten temperatur-sensitiven VSV-G Proteins, das bei einer Inkubationstemperatur von 39,5°C im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und nach einer Temperatursenkung auf 32°C das ER verlässt und über den Golgi Apparat an die

Plasmamembran gelangt. Zum Zeitpunkt $t=0$ min sieht man in beiden Bedingungen (co siRNA und *KIF7* siRNA#1) keine Co-Färbung des GFP-markierten VSV-G Proteins mit dem Golgi Marker GM130. Bereits nach 30 min hat das VSV-G Protein den Golgi Apparat erreicht und nach 60 min ist das Protein an der Plasmamembran darstellbar (Abbildung 19). Zusammengefasst konnten keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den *KIF7* knockdown Zellen festgestellt werden. Das Gfp-markierte VSV-G Protein vollbringt den Weg vom ER zur Plasmamembran in der gleichen Zeit. Der knockdown von *KIF7* zeigte somit keinen Effekt auf die sekretorische Funktion des Golgi Apparats.

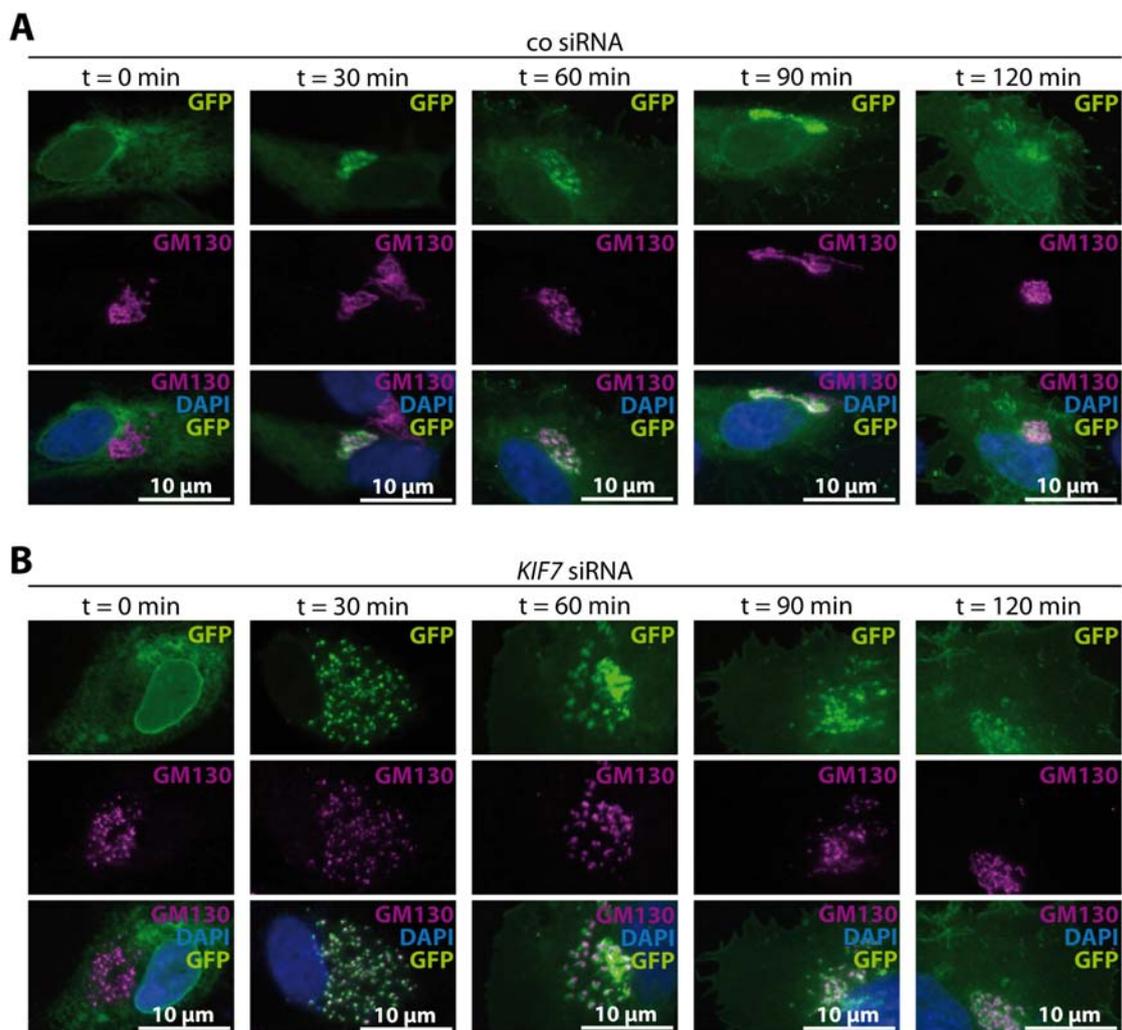


Abbildung 19: Der knockdown von *KIF7* führt nicht zu einem sekretorischen Funktionsverlust des Golgi Apparats in RPE-1 Zellen.

Für den VSV-G assay wurden RPE-1 Zellen mit co siRNA (A) oder *KIF7* siRNA#1 (B) transfiziert. Nach 24 h wurde das temperatur-sensitive VSV-G Protein co-transfiziert. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen bei 32°C inkubiert, um das GFP-markierte VSV- Protein (grün) aus dem ER zu entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen gegen GM130 (magenta) und DAPI (blau) durchgeführt. In beiden Bedingungen (co siRNA und *KIF7* siRNA#1) bewegt sich das VSV G Protein in der gleichen Geschwindigkeit vom ER zur Zellmembran.

5.5.2 Duplikation von Zentrosomen und Reduktion ziliierter Zellen

Neben den dramatischen Veränderungen in der Golgi Struktur, zeigten *KIF7 knockdown* RPE-1 Zellen weitere mildere Phänotypen. Zum einen wurde eine erhöhte Anzahl von Zellen mit duplizierten Zentrosomen nach *knockdown* von *KIF7* (~12%) im Vergleich zur Kontrolle (~2%) festgestellt (Abbildung 20A). Eine weitere Beobachtung war eine ~30%-ige Reduktion in der Anzahl an ziliierten Zellen (Abbildung 20B).

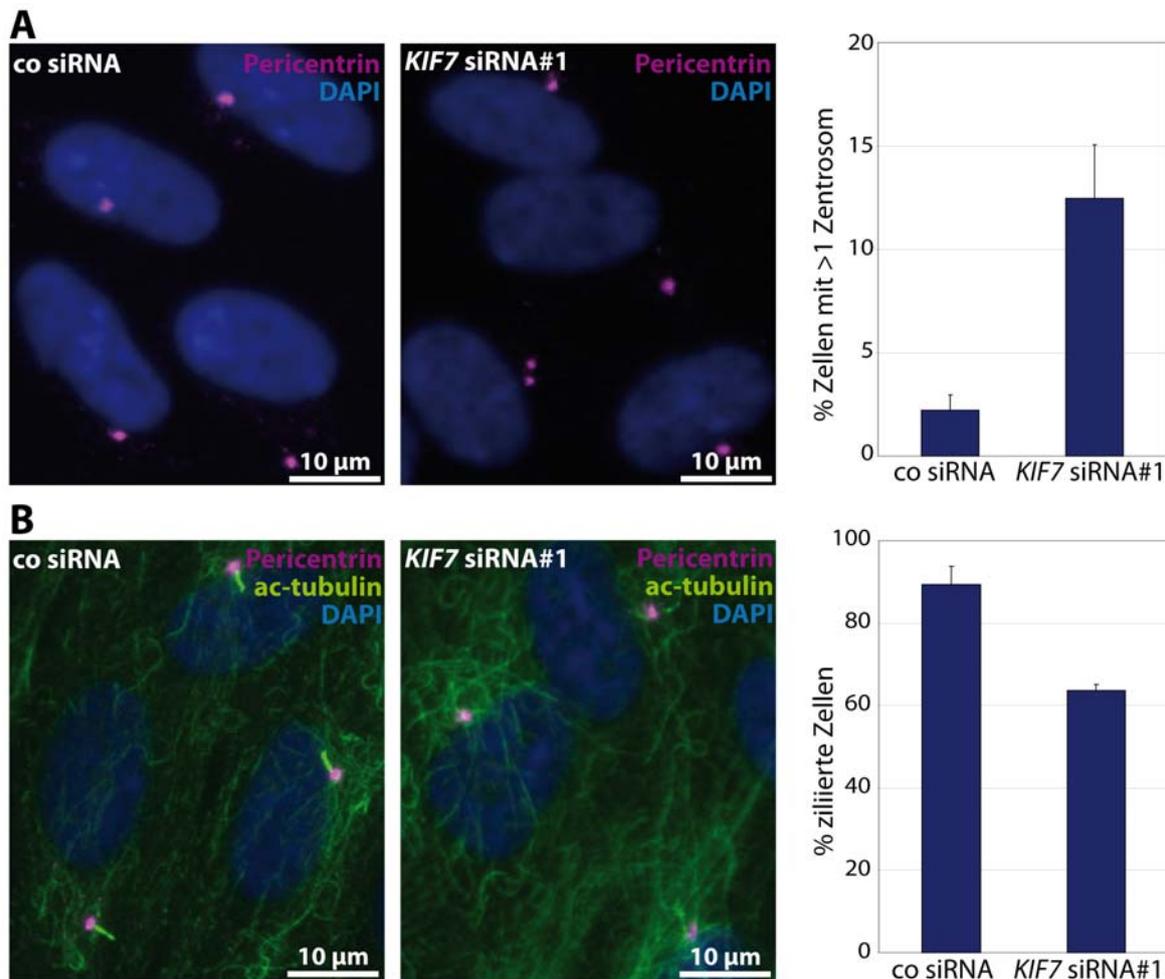


Abbildung 20: Der *knockdown* von *KIF7* führt zu vermehrter Zentrosomenduplikation und weniger zilierten Zellen.

RPE-1 Zellen wurden mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert. Nach Fixierung in PFA wurden die Zellen in Immunfluoreszenzfärbungen für Pericentrin (magenta), acetyliertes Tubulin (grün) und DAPI (blau) markiert und jeweils zwischen 280 und 400 Zellen blind ausgezählt. (A) *KIF7 knockdown* Zellen zeigen eine Vermehrung von duplizierten Zentrosomen um ~10 Prozentpunkte und (B) eine reduzierte Anzahl ziliierter Zellen um knapp 30 Prozentpunkte. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

5.5.3 KIF7 beeinflusst die Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli

Der Nachweis einer Motordomäne in KIF7 deutete darauf hin, dass KIF7, als Motorprotein an Mikrotubuli agiert. Es lag somit die Vermutung nahe, dass der *knockdown* von *KIF7* auch die Dynamik und Struktur von Mikrotubuli verändert. Um diese Hypothese zu testen, wurden RPE-1 Zellen entweder mit siRNA (co siRNA und *KIF7* siRNA#1) oder mit den V5-getaggten Kontrukten V5.EPS¹⁻²²⁵, V5.KIF7 FL und V5.KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³ transfiziert. Nach 48 h (siRNA) bzw. 24 h (Plasmid) wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, um die Depolymerisation der Mikrotubuli herbeizuführen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und in Immunfluoreszenzfärbungen mit den Markern V5-Tag und acetyliertes Tubulin gefärbt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen (co siRNA) konnte in den *KIF7 knockdown* Zellen eine verstärkte Färbung von acetyliertem Tubulin festgestellt werden (Abbildung 21A). Bei den mit V5.EPS¹⁻²²⁵ und V5.KIF7 FL transfizierten Zellen konnte man, außer den acetylierten und dadurch stabilisierten Zilien, keine polymerisierten Mikrotubuli mehr erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die die dominant-negative Trunktion V5.KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³ exprimieren, ein stark ausgeprägtes und gegen die Inkubation auf Eis resistentes Mikrotubulinetzwerk (Abbildung 21B).

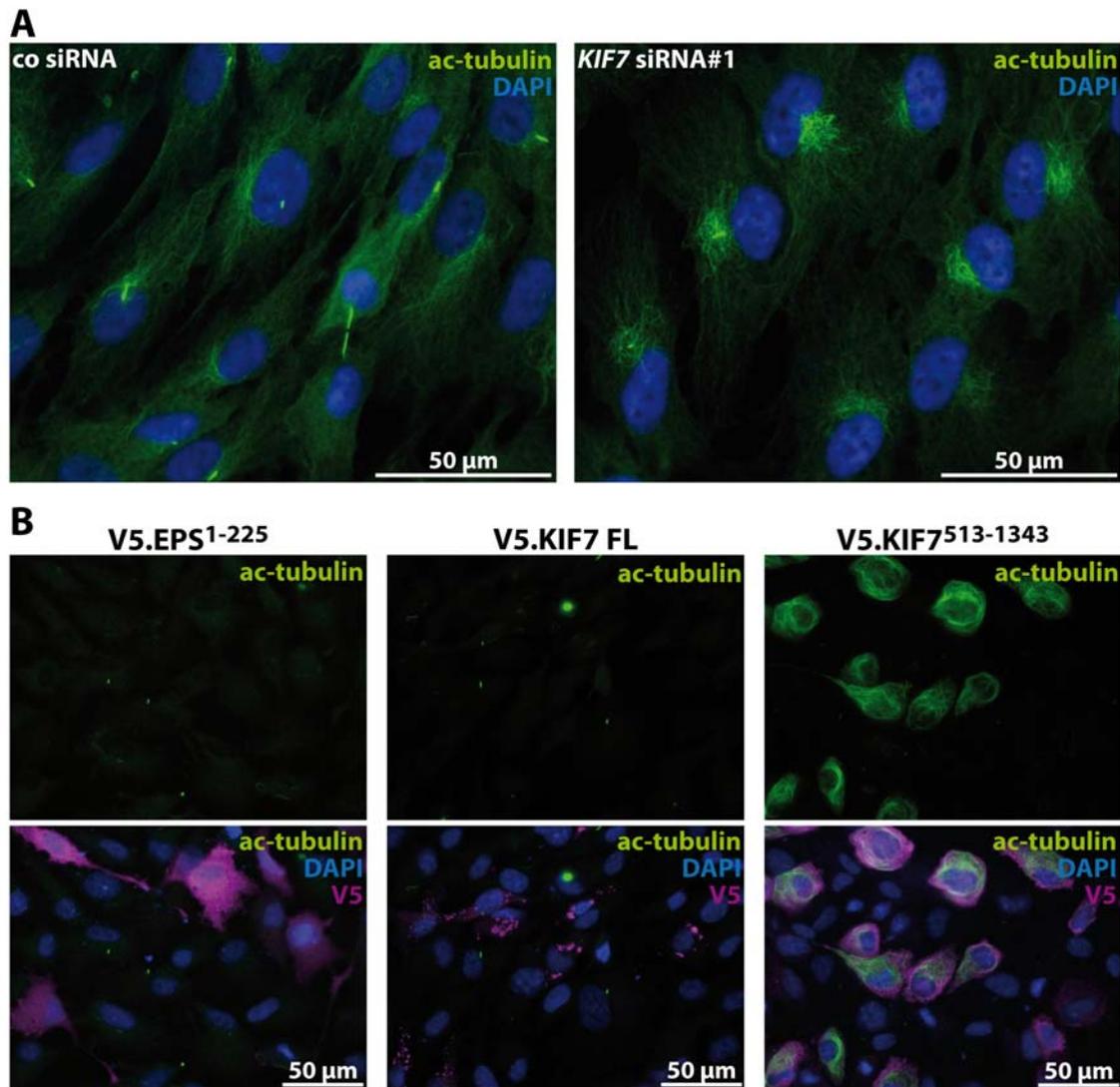


Abbildung 21: *KIF7* knockdown und Überexpression der *KIF7*⁵¹³⁻¹³⁴³ Trunkation stabilisieren Mikrotubuli.

siRNA (co siRNA oder *KIF7* siRNA#1) (A) oder Plasmid (V5.EPS¹⁻²²⁵, V5.*KIF7* FL oder V5.*KIF7*⁵¹³⁻¹³⁴³) (B) transfizierte RPE-1 Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend fixiert. In Immunfluoreszenzfärbungen gegen acetyliertes Tubulin (ac-tubulin, grün), V5 (magenta) und DAPI (blau) zeigen *KIF7* knockdown Zellen und V5.*KIF7*⁵¹³⁻¹³⁴³-exprimierende Zellen eine verstärkte Färbung für acetyliertes Tubulin im Gegensatz zu den Kontrollzellen bzw. den V5.*KIF7* FL-exprimierenden Zellen. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

In Co-Immunopräzipitationsversuchen in HEK293T Zellen konnte gezeigt werden, dass *KIF7* mit der Histondeacetylase HDAC6 in einem Proteinkomplex vorliegt. Exprimiertes HDAC6 co-präzipitiert spezifisch mit *KIF7*, jedoch nicht mit dem Kontrollprotein EPS¹⁻²²⁵ (Abbildung 22A). Um den in den Immunfluoreszenzfärbungen gesehenen Anstieg der Tubulinacetylierung (Abbildung 21) in einer zweiten Methode zu bestätigen, wurden die Plasmide FLAG.EPS¹⁻²²⁵, FLAG.*KIF7* FL und FLAG.*KIF7*⁵¹³⁻¹³⁴³ in An- oder Abwesenheit

von V5.HDAC6 FL in HEK293T transfiziert. Nach 24 h wurden *whole cell lysates* (WCL) gewonnen und die Proteine in einer SDS-PAGE separiert. Auch in HEK293T Zellen führte die Expression der C-terminalen KIF7 Trunkation (KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³) zu einem Anstieg an acetyliertem Tubulin. Diese Acetylierung scheint, im Gegensatz zu den Kontrollen, resistent gegenüber der Anwesenheit von HDAC6 zu sein. Während die Co-Expression von HDAC6 bei KIF7 FL und EPS¹⁻²²⁵ zu einer starken Reduktion an acetyliertem Tubulin führt, zeigt die Anwesenheit von HDAC6 in Gegenwart von KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³ kaum einen Einfluss auf den Acetylierungsstatus des Tubulins (Abbildung 22B).

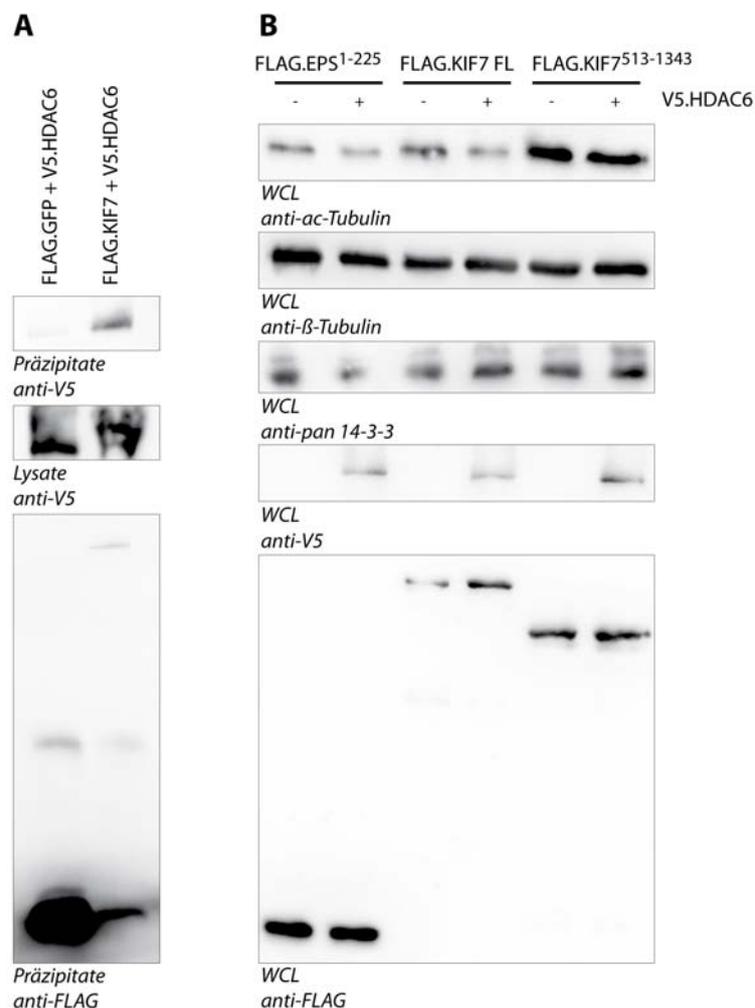


Abbildung 22: KIF7 co-präzipitiert mit der Histondeacetylase 6 (HDAC6) und reguliert dessen Effekt auf die Tubulinacetylierung.

(A) HEK293T Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. HDAC6 co-präzipitiert spezifisch mit KIF7, nicht jedoch mit dem Kontrollprotein EPS¹⁻²²⁵. (B) HEK293T Zellen wurden mit den genannten Plasmiden transfiziert und nach 24 h wurden WCL angefertigt. Durch Co-Expression von HDAC6 wurde die Menge an acetyliertem Tubulin reduziert. Expression von KIF7⁵¹³⁻¹³⁴³, jedoch nicht von KIF7 FL oder ein Kontrollprotein, führten zu einem Anstieg von acetyliertem Tubulin. Diese Hyperacetylierung scheint resistent gegen die Deacetylierung durch HDAC6 zu sein. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

Um zu testen, ob nicht nur die Stabilität der Mikrotubuli durch KIF7 beeinflusst wird, sondern auch deren Wachstum, wurden Repolymerisationsassays durchgeführt. Dazu wurden RPE-1 Zellen mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert. Nach 48 h wurden die Mikrotubuli zuerst durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis depolymerisiert. Anschließend wurde die Repolymerisation durch einen Mediumwechsel mit vorgewärmtem Medium eingeleitet. Nach den angegebenen Zeiten (0, 30, 60, 120, 240 s) wurden die Zellen in 4% PFA fixiert und in IF Färbungen gegen α -Tubulin und den Golgi Marker Golgin97 gefärbt. Die Zellen bauten innerhalb von vier Minuten fast ihr gesamtes Mikrotubulnetzwerk wieder auf. In der Geschwindigkeit zeigten die Kontrollzellen und die *KIF7 knockdown* Zellen keinen offensichtlichen Unterschied. Während die Mikrotubuli in den Kontrollzellen aber geradlinig und zielgerichtet ihren Weg Richtung Zellperipherie fanden, sah das Muster der neugebildeten Mikrotubuli in den *KIF7 knockdown* Zellen deutlich unstrukturierter und unorientierter aus (Abbildung 23).

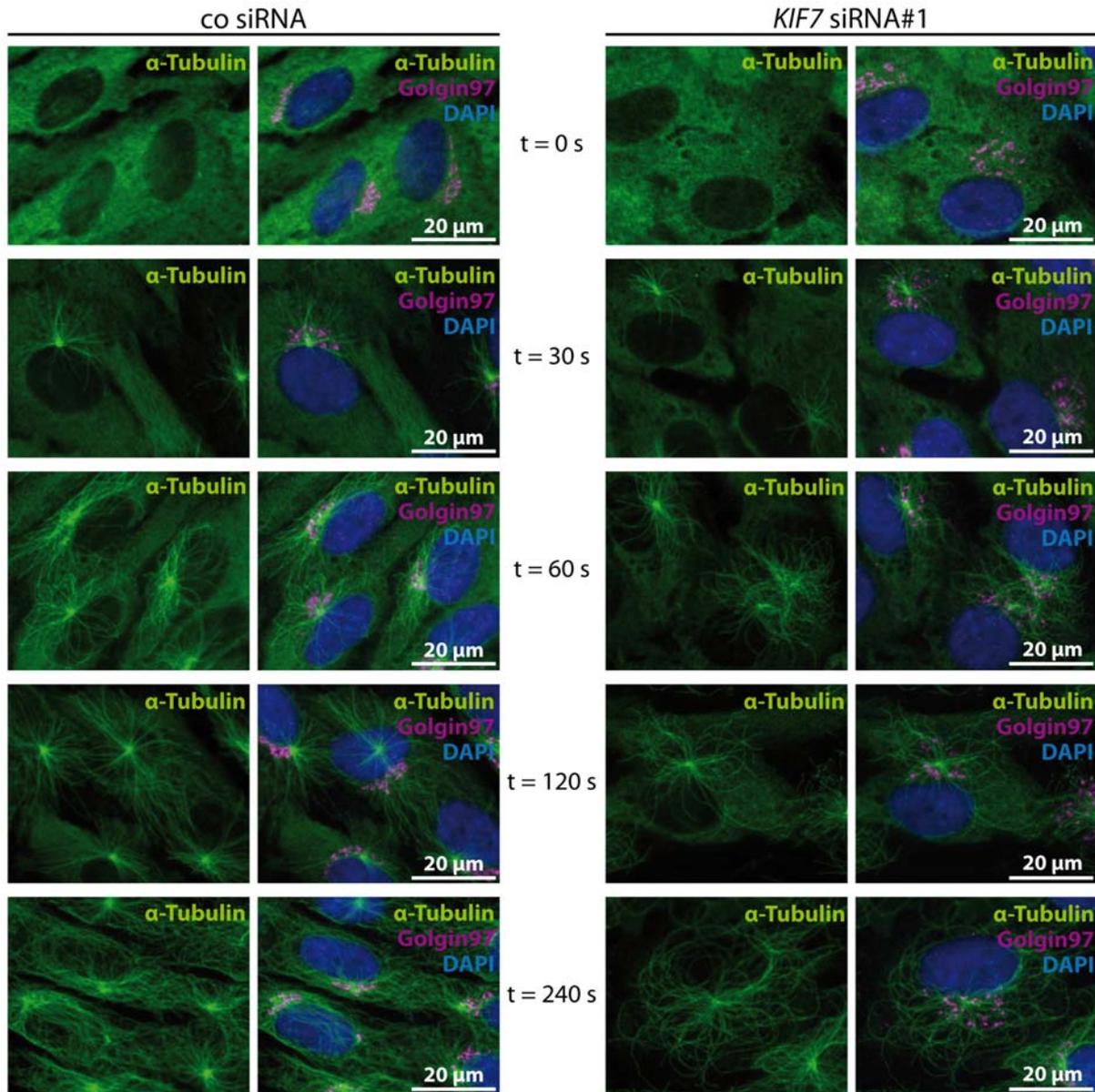


Abbildung 23: KIF7 beeinflusst die Dynamik von Mikrotubuli.

RPE-1 Zellen wurden mit co siRNA (linke Spalte) oder *KIF7* siRNA#1 (rechte Spalte) transfiziert. Nach 48 h wurden die Mikrotubuli zuerst durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis depolymerisiert und anschließend durch Zugabe von vorgewärmtem Medium wieder repolymerisiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten fixiert und gegen α -Tubulin (grün), Golgin97 (magenta) und DAPI (blau) gefärbt. Der Aufbau der Mikrotubuli in *KIF7* knockdown Zellen verläuft deutlich ungeordneter und unorientierter als in den Kontrollzellen. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

5.6 KIF7 beeinflusst die Zellpolarität

Ein weiterer Phänotyp, der vor allem bei den Repolymerisationsassays auffiel, ist eine veränderte Form von *KIF7 knockdown* Zellen. Konfluent wachsende RPE-1 Zellen zeigen normalerweise eine sehr lange und dünne Form und ordnen sich parallel nebeneinander an. Die Anordnung und auch diese Form war nach Behandlung mit *KIF7* siRNA#1 nicht mehr sichtbar. Im Gegenteil, die Zellen waren deutlich größer und nicht mehr spindelförmig, sondern eher rechteckig (Abbildung 24A). Es könnte also eine Störung der Zellpolarität vorliegen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen KIF7 und Polaritätsproteinen zu untersuchen, wurde zunächst in Co-IP Versuchen mit den Proteinen PAR3, PAR6 und APKC getestet, ob KIF7 mit den Proteinen des Par-Polaritätskomplexes assoziiert ist. KIF7 co-präzipitierte spezifisch mit PAR3, aber nicht mit Par6 oder aPKC (Abbildung 24B). Diese Interaktion konnte auf den Colied-Coil Domänen-haltigen C-Terminus von PAR3 (Aminosäuren 937-1337) und den C-Terminus (Aminosäuren 1083-1343) von KIF7 kartiert werden (Abbildung 24C-E).

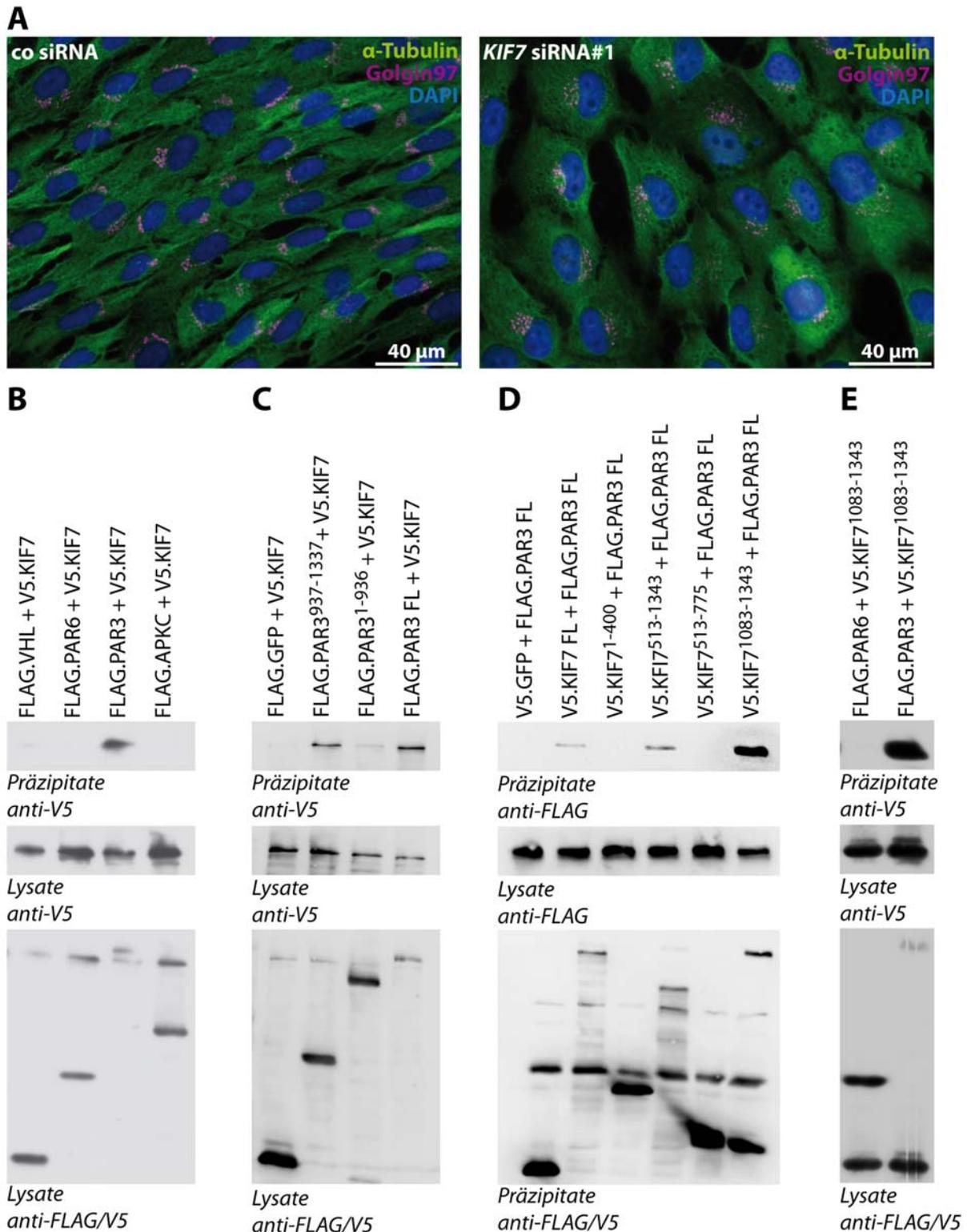


Abbildung 24: KIF7 co-präzipitiert mit PAR3 und beeinflusst die Zellpolarität.

(A) RPE-1 Zellen wurden mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 und nach einer 45-minütigen Inkubation auf Eis fixiert und gegen α -Tubulin (grün), Golgin97 (magenta) und DAPI (blau) gefärbt. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen, die ihre normale langgezogene Gestalt annahmen, hatten die *KIF7* knockdown Zellen eine veränderte Form und waren im Verhältnis sehr groß. (B-E) In Co-IP Experimenten konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Domänen von KIF7 und PAR3 spezifisch miteinander präzipitieren. Modifiziert aus Dafinger et al. (2011)²⁸.

5.7 KIF7 hat einen Effekt auf die Migration und den Zellzyklus

Um die funktionelle Bedeutung einer gestörten Zellpolarität von *KIF7 knockdown* Zellen im Zellverband zu untersuchen, wurde die Migrationfähigkeit in einen Migrationsassay untersucht. Dazu wurden RPE-1 Zellen mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert und in eine spezielle mikroskopiergeeignete Kulturschale mit integriertem *culture insert* gesplittet. Nach Entfernung des *culture inserts* entstand ein unbewachsener, freier Spalt zwischen den Zellen, der von diesen dann durch Migration wieder beansprucht werden kann. Es wurden unter optimalen Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂) am konfokalen Mikroskop von den Zellen alle 15 min eine Aufnahme im DIC Kanal erstellt. Während die Kontrollzellen innerhalb von 25 h die Hälfte der Lücke erreicht haben, wandern nur vereinzelt *KIF7 knockdown* Zellen in den Spalt ein. Der *knockdown* von *KIF7* verursacht in RPE-1 eine stark reduzierte Migrationsfähigkeit (Abbildung 25).

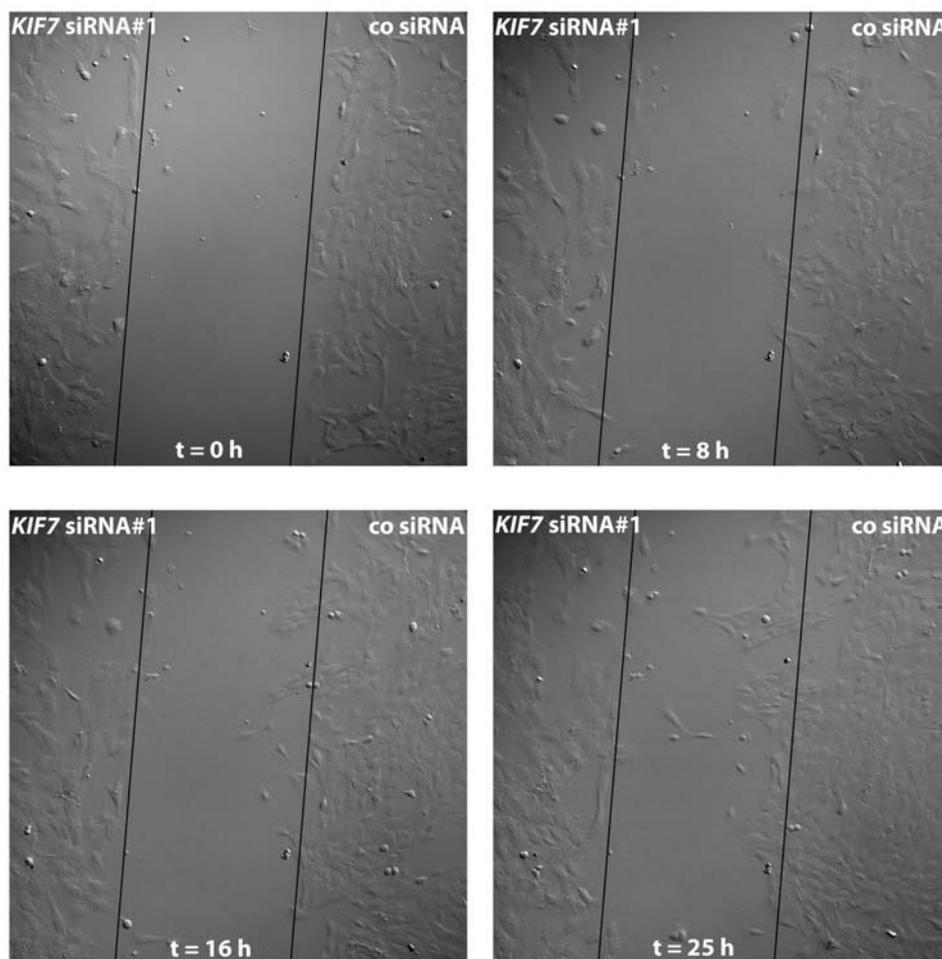


Abbildung 25: Im Migrationsassay zeigen *KIF7 knockdown* Zellen eine reduzierte Migrationsfähigkeit.

RPE-1 Zellen wurden mit co siRNA (rechts) oder *KIF7* si RNA#1 (links) transfiziert und in einem Migrationsassay über 25 h beobachtet. *KIF7 knockdown* Zellen zeigen eine stark reduzierte Migration im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Beim Betrachten des Videos des Migrationsassays fiel auf, dass die *KIF7 knockdown* Zellen eine massive Reduktion an Zellteilungen zeigen. Den Einfluss von KIF7 auf den Zellzyklus wurde mit Hilfe einer Durchflusszytometrie Analyse untersucht. U2OS Zellen wurden mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert und die DNA mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Es wurden pro Experiment und Bedingung (co siRNA oder *KIF7* siRNA#1) drei bis sieben Messungen gemacht, bei denen jeweils 25.000 bis 35.000 Zellen gezählt und im FL-2 Kanal aufgenommen wurden. Aus den Resultaten wurden Histogramme erstellt, die die totale Zellzahl pro DNA-Gehalt darstellen (Abbildung 26A+B). Aufgrund der Position der Peaks und der FL-2 Werte konnten die drei Zellzyklusphasen (G_0/G_1 , S und G_2/M) bestimmt werden. Die prozentuale Zellzahl in den einzelnen Zellzyklusphasen wurden dann für co siRNA und *KIF7* siRNA#1 behandelte Zellen in einem Graph dargestellt (Abbildung 26C). Der *knockdown* von *KIF7* in U2OS Zellen führt zu einer Verschiebung der Zellzahl Richtung G_2/M -Phase.

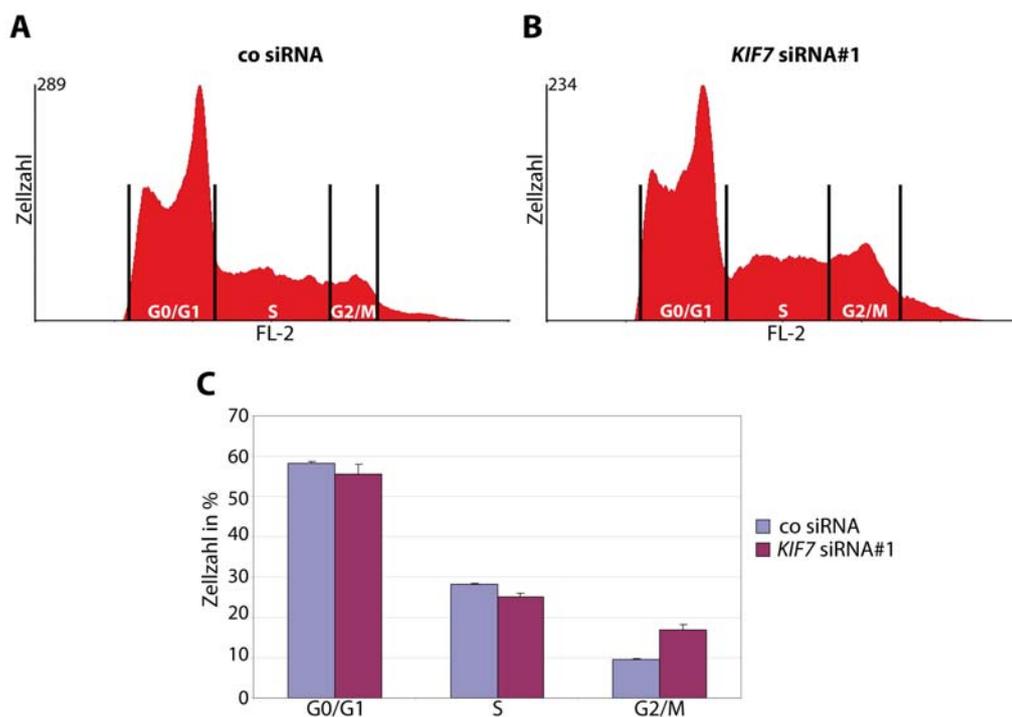


Abbildung 26: Der *knockdown* von *KIF7* in U2OS Zellen verursacht eine Verschiebung des Zellzyklus Richtung G_2/M .

U2OS Zellen wurden mit co siRNA oder *KIF7* siRNA#1 transfiziert und die DNA mit PI gefärbt. (A+B) Beispiel für eine Darstellung der Zellzahl pro DNA-Gehalt (FL-2) in einem Histogramm für co siRNA (A) und *KIF7* siRNA#1 (B) behandelte Zellen. Daraus kann man die Regionen für die drei Zellzyklusphasen G_0/G_1 , S und G_2/M ableiten. (C) Representative Darstellung der Quantifizierung der prozentualen Zellzahl in den einzelnen Zellzyklusphasen. Es wurde für jede Bedingung der Mittelwert aus fünf Messungen und als Fehlerindikator der entsprechende mittlere Standardfehler berechnet.

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblicke in die molekularen Grundlagen und die Pathophysiologie des Joubert-Syndroms (JBTS) zu gewinnen. Durch die Identifizierung neuer JBTS-verursachenden Gene konnte das Verständnis der zugrundeliegenden zellulären Krankheitsmechanismen in den vergangenen Jahren deutlich verbessert werden. Ein solches Verständnis ist notwendig, um die symptomale Behandlung von Patienten zu optimieren und individuell anpassen zu können.

6.1 Mutationen in *KIF7* verursachen das Joubert-Syndrom

Das JBTS ist eine seltene autosomal oder X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die sich klinisch durch Ataxie, muskuläre Hypotonie und in vielen Fällen mit einem auffälligen Atemmuster, einem Nystagmus und einer Entwicklungsverzögerung präsentiert. Die genetischen und zellbiologischen Arbeiten der vergangenen Jahre haben das JBTS als Ziliopathie klassifiziert^{6,205,206}. Ebenso wie bei anderen Ziliopathien können Mutationen in verschiedenen Genen mit den gleichen klinischen Merkmalen assoziiert sein (Lokus-Heterogenität). Inzwischen wurden 19 verschiedene Loci für JBTS identifiziert. Gleichzeitig können unterschiedliche Mutationen des gleichen JBTS Gens verschiedene Phänotypen verursachen (allelische Heterogenität)⁶. Ein Beispiel für die klinische Variabilität ziliärer Gene stellt *CEP290* dar, für das Mutationen in *MKS*^{207,95}, *JBTS*^{17,18}, *SLS*¹⁸, *NPH*^{17,18}, *BBS*²⁰⁸ und *LCA*²⁰⁹ beschrieben wurden²¹⁰. Für verschiedene Mutationen in *KIF7* wurden bislang drei verschiedene syndromale Phänotypen (*JBTS*²⁸, *ACLS* und *HLS*²⁹) beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die genetischen Grundlagen einer ägyptischen Familie mit zwei betroffenen Kindern (E1 und E2) mit JBTS untersucht. Aufgrund der Konsanguinität der Eltern und der rezessiven Vererbung des JBTS wurde von einer homozygoten Allelverteilung in beiden betroffenen Kindern ausgegangen. Mutationen in den zu diesem Zeitpunkt bekannten JBTS Genen (*JBTS1-11*) erklärten nur geschätzte 50% der JBTS Fälle⁶. Nachdem in allen bekannten autosomal-rezessiv vererbten JBTS Genen keine Mutationen nachgewiesen werden konnten, wurde eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Dadurch konnte ein neuer Locus für das Joubert-Syndrom und im Folgenden ein neues JBTS-verursachendes Gen (*JBTS12*, *KIF7*, HGNC Zugangscode für *KIF7* [alias *JBTS12*]: 30497) identifiziert werden²⁸.

In 79 weiteren gescreenten JBTS Patienten wurden zwei weitere heterozygote Mutationen gefunden. Das macht *KIF7* zu einem niedrig frequentiert mutierten Gen in JBTS. Der schwerwiegendste Phänotyp konnte in den Patienten E1 und E2 mit einer biallelischen 1 bp-Deletion im ersten Exon in *KIF7* beobachtet werden. Das dadurch entstehende massiv trunkierte Protein kann somit seine Funktion nicht mehr ausführen (*loss-of-function*) oder wird abgebaut (*nonsense mediated decay*).

Dem Patienten G1 wurde als Kleinkind die Diagnose JBTS gestellt, untermauert durch ein klassisches *Molar Tooth Sign* (MTS) im MRT. Er weist relativ milde Symptome (unbegründete Aggressivität) ohne die klassischen phänotypischen Stigmata des JBTS auf und zeigt eine schwache mentale Retardierung. Die bei diesem Patienten gefundene 1 bp-Deletion in Exon 3 liegt inmitten der kodierenden Sequenz der Motordomäne und führt ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch und somit voraussichtlich auch zum Funktionsverlust (*loss-of-function*). In diesem Patienten konnten weder weitere Mutationen in den bis dahin bekannten autosomal-rezessiven JBTS Genen noch eine größere Deletion innerhalb des *KIF7* Locus gefunden werden. Aufgrund der Symptomfreiheit der Mutter (auch heterozygot für die *KIF7* Mutation) ist davon auszugehen, dass bei diesem Patienten mindestens eine weitere Mutation in einem funktionell verwandten Gen, das noch nicht mit JBTS in Verbindung gebracht wurde, oder eine zweite *KIF7* Mutation, die nicht durch die verwendeten Nachweismethoden gefunden wurde (z.B. intronisch oder in einer regulatorischen Region außerhalb der CDS), vorliegt.

Auch die Patientin G2 zeigt auch ein typisches MTS im MRT und hatte Atemprobleme im Säuglingsalter. Bei dieser Patientin steht eine ausgeprägte Verhaltensproblematik mit autistischen Zügen im Vordergrund. Ultrasonographisch konnten Zysten in Leber und Nieren nachgewiesen werden. Die fazialen Dysmorphien sind schwächer ausgeprägt als in den Patienten E1 und E2. Diese Patientin hat eine heterozygote 12 bp-Deletion am C-terminalen Ende von *KIF7*, welche zu einer *in-frame* Deletion von vier Aminosäuren (p.R1329_S1332del) führt. Der C-Terminus von *KIF7* ist hoch konserviert (Abbildung 7C) und wird an der Position S1332 phosphoryliert²¹¹. Somit zieht die Deletion wahrscheinlich eine strukturelle oder funktionelle Veränderung nach sich. In dieser Patientin wurden in dem bekannten JBTS Gen *TMEM67* zwei *compound* heterozygote Mutationen gefunden, von denen jeweils eine von den Eltern vererbt wurde. Diese beiden hypomorphen Mutationen wurden des öfteren in Patienten mit COACH-Syndrom (*cerebellar vermis hypo/aplasia, oligophrenia, congenital ataxia, ocular coloboma, and hepatic fibrosis*, JBTS mit Kolobom und kongenitaler Leberfibrose) gefunden, aber nie in dieser Kombination^{131,132}. Die

vorhergehende Schwangerschaft in dieser Familie wurde in der 20. Schwangerschaftswoche abgebrochen. Grund dafür war eine ausgeprägte Enzephalozele mit Hydrozephalus. Enzephalozelen sind ein klassisches Symptom des Meckel-Gruber-Syndroms, dessen variabler Phänotyp einen fließenden Übergang zum Joubert-Syndrom zeigt²¹⁴. Die Erkrankung resultiert hier vermutlich aus der Auslastung mit drei mutierten Allelen in zwei JBTS Genen. Ähnliche Konstellationen wurden bereits auch für die Ziliopathie Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) gezeigt²¹⁵.

KIF7 gehört zu der Kinesin 4 Familie der Kinesine. Als N-Kinesin ist die Motordomäne (aa 9-347)²¹⁶ am N-Terminus des Proteins lokalisiert. Für ihre Aktivität enthält die Motordomäne eine putative ATP-Bindedomäne (aa 94-101)²¹⁷. Der C-Terminus (Tail, aa 1216-1343)²¹⁶ des Proteins wird für den Transport von Proteinen oder Organellen (Cargo) entlang der Mikrotubuli genutzt. Der Mittelteil des Proteins wird diskontinuierlich von putativen Coiled-Coil (CC)-Domänen (aa 480-542, aa 698-1057, aa 1109-1211)²¹⁷ dominiert, welche möglicherweise zur Dimerisierung von KIF7 führen. Eine solche Funktion der CC-Domänen wurde bereits für andere Kinesine gezeigt²¹⁸⁻²²². Die einzigen bekannten posttranslationalen Modifikationen von KIF7 sind Phosphorylierungen an vier verschiedenen Serinen: S895²²³, S898²²⁴, S1289²²³, S1332²¹¹ (Abbildung 27).

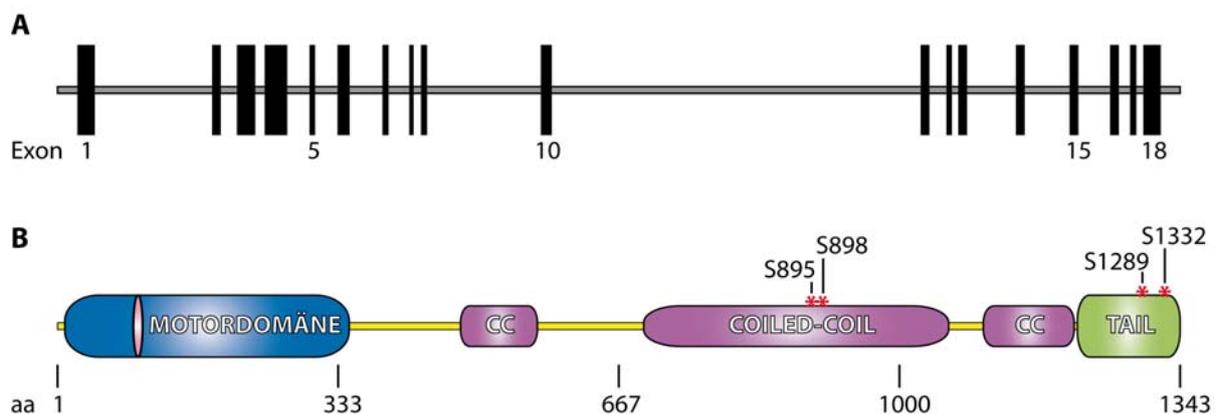


Abbildung 27: KIF7 Genstruktur und schematische Darstellung von KIF7.

(A) Massstabgetreue Illustration der Genstruktur des humanen *KIF7*s. Die schwarzen Balken stellen die 18 Exone dar, die Breite der Balken entspricht der Länge der Exone (B) Darstellung der Proteinstruktur von *KIF7*. In der N-terminalen Motordomäne (blau) ist eine putative ATP-Bindedomäne (rosa) eingebettet. Die Tail-Domäne (grün) ist für Bindung und Transport von Cargo zuständig. Diese Domänen werden von den Coiled-Coil (CC)-Domänen (violett) enthaltenen Mittelteil verbunden. *KIF7* wird posttranslational durch Phosphorylierung (rote Sterne) an den Aminosäureresten S895, S898, S1289 und S1332 modifiziert.

KIF7 ist ein essentieller Regulator der *Sonic Hedgehog* (Shh) Signaltransduktion^{179,225}. Interessanterweise wurde bereits für die zwei bekannten JBTS Proteine ARL13B²² und RPGRIP1L²²⁶ eine Rolle bei der Shh Signaltransduktion beschrieben. Der Shh Signalweg ist abhängig von primären Zilien²²⁷. Es erscheint somit gut möglich, dass ein Funktionsverlust von Zilien in Ziliopathien zu Veränderungen in der Shh Signaltransduktion führt. Der Funktionsverlust von *Kif7* in der Maus führt zu Polydaktylie, Exenzephalie, Skelettdefekten und früher Sterblichkeit^{30,179,225}. Diese Symptome spiegeln die Merkmale von verschiedenen Mausmodellen sowohl für den *Hedgehog* (Hh) Signaltransduktionsweg (z.B. *Gli3*^{-/-} Maus²²⁸) als auch für das JBTS (z.B. *Inpp5e*^{-/-} Maus⁹⁷) wider. Passend hierzu fand sich eine Polydaktylie in Patient E1.

Frühere Studien zeigten, dass KIF7 mit den Hedgehog (Hh) Transkriptionsfaktoren GLI2 und GLI3 interagiert und die GLI2-abhängige Transkription hemmt²²⁵. Außerdem ist KIF7 wichtig für die Lokalisierung von GLI3 an der Spitze primärer Zilien nach Hh-Aktivierung und die Spaltung von GLI3 in seine Repressorform^{179,229}. KIF7 selbst akkumuliert vermutlich durch seine Motordomäne an der Spitze primärer Zilien nach Aktivierung des Hh-Signalwegs^{30,179}. Neben seiner Rolle als negativer Regulator des Shh-Signaltransduktionsweges in Abwesenheit des Shh-Liganden, agiert KIF7 vermutlich im gleichen Proteinkomplex als positiver Interaktor als Antwort auf die Anwesenheit von Shh und die damit verbundene Aktivierung des Shh-Signalwegs^{30,230}. Die duale Rolle von KIF7 könnte durch eine veränderte Lokalisation an der Spitze des Ziliums hervorgerufen werden. Die Spitze eines Ziliums ist ein spezialisiertes Segment, dem neben der Regulation von Signaltransduktionswegen bereits andere Funktionen zugeschrieben wurden. Zum Beispiel werden an der ziliären Spitze Exosomen abgeschnürt, wodurch unter anderem die ziliären Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 (PC-1, PC-2) und Fibrocystin (FPC) von der Zelle entsorgt werden²³¹⁻²³³.

Zusammenfassend legen diese Befunde nahe, dass KIF7 wesentlich in die Regulation des Shh-Signalweges eingreift und dass eine gestörte Regulation der Shh Signaltransduktion zum klinischen Erscheinungsbild des JBTS führen kann.

Das erstellte Expressionsprofil von *KIF7* (Abbildung 9) zeigt eine starke Expression im Kleinhirn, was im Einklang mit veröffentlichten RNA *in situ* Hybridisierungsdaten (verfügbar im Allen Mouse Brain Atlas²³⁴) steht. Dieser Befund passt zu dem Symptom der Ataxie der JBTS Patienten, die am ehesten durch die Fehlbildung der Vermis (sichtbar als MTS^{4,5}) verursacht wird.

6.2 KIF7 lokalisiert an primären Zilien und spielt eine Rolle in der Strukturhaltung verschiedener Zellorganellen

6.2.1 KIF7 lokalisiert an primären Zilien

Mit Hilfe der Flp-In Technologie²³⁵ konnte eine Zelllinie generiert werden, die aufgrund einer singulären Integration der CDS eine annähernd endogene Menge an rekombinanten KIF7-GFP Fusionsprotein exprimiert. Durch Co-Färbungen mit dem Zilienmarker acetyliertes Tubulin und dem Zentrosomenmarker Pericentrin wurde die ziliäre Lokalisation von KIF7 bestätigt^{30,179}.

Diese Zelllinie kann nun dazu verwendet werden, um die Rolle von KIF7 in der molekularen Pathogenese des JBTS besser zu verstehen, indem man z.B. mittels *live imaging* gezielt nach genetischen und pharmakologischen Faktoren sucht, die die Lokalisation von KIF7 und/oder die Aktivität des Shh-Signaltransduktionsweg beeinflussen.

6.2.2 KIF7 interagiert mit dem Nephronophthise Protein NPHP1 (JBTS4)

Man geht augenblicklich davon aus, dass humane Ziliopathieproteine in Multiproteinkomplexen fungieren^{37,236}. Der sehr stabile BBSome Proteinkomplex z.B. besteht aus mindestens acht BBS Proteinen (BBS1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 und BBIP10), die u.a. am Aufbau von primären Zilien beteiligt sind²³⁷. Auch die NPH, JBTS und MKS Proteine agieren in einem mehrere hundert Interaktor großen Komplex, der in verschiedene Module eingeteilt wird³⁷.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass KIF7 mit dem bekannten JBTS4 Protein NPHP1¹⁵, einem Mitglied des NPHP-Komplexes, interagiert. NPHP1 lokalisiert sowohl an primären Zilien¹⁶ als auch am Golgi Apparat²³⁸. Auch in dem Nematoden *C. elegans*, in dem NPHP1 konserviert ist, lokalisiert das Homolog *nph-1* an der Transitionszone von sensorischen Zilien in zilierten Neuronen²³⁹⁻²⁴¹.

Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion von KIF7 mit dem JBTS1 Protein INPP5E gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Genau wie NPHP1 lokalisiert INPP5E ebenfalls am Golgi Apparat²⁴². Der funktionelle Komplex aus ARL13B, PDE6D und CEP164 und die *ciliary targeting sequence* (CTS) von INPP5E lokalisiert INPP5E auch ins Zilium²⁴³. Außerdem beeinflusst INPP5E die PDGF-induzierte Phosphorylierung von AKT²⁴⁴. Anders als INPP5E zeigte KIF7 keinen Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung als Antwort auf die

Stimulierung mit PDGF BB (Daten nicht gezeigt). Dies lässt, trotz des Effekts beider Proteine auf den Shh Signalweg, für KIF7 und INPP5E unterschiedliche molekulare Krankheitsmechanismen vermuten.

6.2.3 **Knockdown von KIF7 führt zur Fragmentierung des Golgi Apparats**

Der *knockdown* von KIF7 in RPE-1 Zellen induzierte eine Veränderung der Lokalisation von NPHP1 im Golgi Apparat, was auf eine massive Fragmentierung des Golgi Apparats zurückzuführen war. Während der Golgi Apparat in Kontrollzellen in perinukleären Schichten lokalisiert war, reichten die wenig zusammenhängenden Golgi Vesikel in KIF7-defizienten Zellen weit in das Zytoplasma. Ein ähnlicher, aber geringer ausgeprägter Phänotyp wurde 2006 für die beiden Kinesin 2 Untereinheiten KAP3 und KIF3A beschrieben^{245,246}. Es konnte gezeigt werden, dass der anterograde sekretorische Transport nicht beeinflusst wurde, während der retrograde Transport stark behindert wurde²⁴⁵. Der retrograde Transport ist jedoch essentiell, um die Golgi Vesikel an den Minusenden der Mikrotubuli zu konzentrieren.²⁴⁷ KIF3A spielt somit eine Rolle bei der Organisation des Golgi Komplexes, was eine Verbindung der Motoraktivität von Kinesinen mit der Morphologie von Organellen schafft. Für KIF7 werden zukünftige Arbeiten den molekularen Mechanismus weiter aufarbeiten müssen.

Interessanterweise führte die exogene Expression einer Trunkation von KIF7, der die N-terminale Motordomäne fehlt (KIF7 DN), auch zur Fragmentierung des Golgi Apparats, und somit dem gleichen Phänotyp wie der *knockdown* von KIF7. Dies legt nahe, dass diese Trunkation dominant-negativ (DN) agiert. KIF7 DN-überexprimierende Zellen zeigten eine massive Ausprägung der Fragmentierung. Denkbar erscheint ein Mechanismus, bei dem das in diesen Zellen noch vorhandene endogene KIF7 WT Protein zwar theoretisch noch seine Arbeit erfüllen und voraussichtlich mit seiner Motordomäne richtig an Mikrotubuli binden kann. Die deutlich im Überschuss vorhandenen KIF7 DN Proteine würden in Konkurrenz zum endogenen KIF7 das reguläre Cargo von KIF7 binden, verblieben dann aber frei im Zytoplasma, da sie durch die fehlende Motordomäne nicht an Mikrotubuli binden könnten. Durch Expression von KIF7 FL hingegen konnte der siRNA-induzierte Phänotyp des Golgi Apparats rückgängig gemacht werden. Da die KIF7 siRNA#1 gegen die 3'UTR von KIF7 gerichtet ist, ist eine exogen eingebrachte kodierende Sequenz eines KIF7 FL-Konstrukts resistent gegen die siRNA und kann die Funktion des fehlenden endogenen Proteins ersetzen. Diese Daten untermauern die Spezifität des Effekts der siRNA. Sowohl durch den *knockdown* von KIF7 als auch durch Expression von KIF7 DN fehlt der Zelle die korrekte KIF7

Motoraktivität. Die KIF7 Motordomäne spielt also eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Struktur des Golgi Apparats.

Funktionell konnte in VSV-G Assays gezeigt werden, dass die Sekretion durch den Golgi Apparat nicht eingeschränkt war. Der Transport vom ER durch den Golgi Apparat zur Plasmamembran benötigte in Kontrollzellen und *KIF7 knockdown* Zellen die gleiche Zeit. Die Fragmentierung des Golgi Apparats betraf alle drei Komponenten (Cis, Medial, Trans). Die einzelnen fragmentierten Golgi Vesikel enthielten jeweils alle drei Golgi Kompartimente, so dass jedes Vesikel für sich die normale Funktion ausführen konnte. Auch während der Mitose fragmentiert der Golgi Apparat reversibel in Vesikel und Kanälchen, die gleichmäßig über die Tochterzellen verteilt sind²⁴⁸, wobei er seine Funktion nicht verliert.

Interessanterweise zeigt der Golgi Apparat auch in vielen neurodegenerativen Erkrankungen morphologische Veränderungen, wie z.B. den Verlust der normalen Golgi Netzwerkanordnung, welche durch getrennte kleine Vesikel ersetzt wird²⁴⁹⁻²⁵². Untersuchungen an humanem Gehirngewebe und Tiermodellen haben eine Fragmentierung des Golgi Apparats auch in Alzheimer-Krankheit (AK)²⁵³, amyotrophe Lateralsklerose (ALS)²⁵⁴, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK)²⁵⁵, Multisystematrophie (MSA)^{256,257}, Parkinson-Krankheit (PK)²⁵¹, Spinocerebelläre Ataxien (SCA, *spinocerebellar ataxias*) Typ2²⁵⁸ und Niemann-Pick-Krankheit Typ C (NPC)²⁵⁹ gezeigt. Zudem gibt es Hinweise für eine Golgi Fragmentierung in einem frühen, vorklinischen Stadium der Neurodegeneration^{252,260}. Die Zerstreuung des Golgi Apparats scheint ein klassisches Merkmal von neurodegenerativen Erkrankungen zu sein²⁴⁹. Es wird spekuliert, dass der Status des Golgi Apparats in Zukunft eventuell als Index für den Degenerationsfortschritt verwendet werden²⁶¹. Auf Grund der unterschiedlichen Ursachen und Verläufe von neurodegenerativen Erkrankungen und dem entwicklungsneurologischen Krankheitsbild des JBTS erscheinen verschiedene Pathomechanismen für die Fragmentierung des Golgi Apparats verantwortlich. Die Fragmentierung des Golgi Apparats in neurodegenerativen Erkrankungen wird vermutlich durch verschiedene Mechanismen, die die Interaktion eines mutierten Proteins mit einem oder mehreren Proteinen, die in der Instandhaltung der Golgi Struktur involviert sind, verursacht²⁴⁹. Ein prinzipiell ähnlicher Mechanismus wäre auch für den Phänotyp in den *KIF7 knockdown* Zellen vorstellbar. Konkret scheint der Golgi-Phänotyp aufgrund einer KIF7-Dysfunktion auf die Veränderungen der Mikrotubuli-Dynamik zurückzuführen zu sein. Ähnliche Veränderungen des Golgi Komplexes durch Mikrotubuli-Beeinflussung sind bereits beschrieben worden²⁶².

6.2.4 Knockdown von KIF7 führt zur Reduktion der Anzahl ziliierter Zellen und zur vermehrten Duplikation von Zentrosomen

Der *knockdown* von *KIF7* führt zu einer Reduktion der Anzahl an zilierten Zellen. Ähnliche Phänotypen wurden bereits für die JBTS Proteine TMEM216⁹ und AHI1²⁶³ publiziert. Wie bereits oben beschrieben, ist *KIF7* wesentlich an der Regulation der Zilien-abhängigen Shh Signaltransduktion beteiligt. Der Shh Signaltransduktionsweg wiederum spielt eine kritische Rolle in der Entwicklung und der Neurogenese des Zerebellums. Die Verbindung zwischen Zilien, Shh Signaltransduktion und der Entwicklung des Zerebellums könnte eine gute Erklärung für die zerebralen Fehlbildungen, die u.a. in Patienten mit JBTS auftreten, liefern (zusammengefasst in²⁶⁴). Als möglicher Mechanismus wäre denkbar, dass durch den Verlust der Funktion von *KIF7* in den Patienten die Shh Signaltransduktion gestört ist und es dadurch zu einer verzögerten oder fehlenden Bildung von definierten Gehirnarealen und im Folgenden zu Entwicklungsstörungen kommt.

Ein weiterer Effekt des *knockdowns* von *KIF7* in RPE-1 Zellen war eine vermehrte Präsenz von duplizierten Zentrosomen. Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen das zentrioläre Protein CEP170, einem Marker für reife Zentriolen²⁶⁵, zeigten in *KIF7 knockdown* Zellen eine vollkommene Co-Lokalisation mit dem Pericentrin Signal. Dieser Befund spricht für das Vorliegen von zwei Zentrosomen und gegen einen Defekt der Zentriolen-Kohärenz als Ursache des doppelten Pericentrin-Signals (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Anzahl an Zellen mit verdoppelten Zentrosomen könnte die in Durchflusszytometrie Untersuchungen beobachtete Störung im Zellzyklus sein (siehe 6.3). Wenn sich die Zelle nach der Synthesephase nicht teilen kann, verbleibt diese in der G₂/M-Phase und die beiden Zentrosomen in der Zelle. Diese Annahme unterstützt auch den Zilienphänotyp, denn Zilien werden erst in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus gebildet. Der Befund des fragmentierten Golgi Apparats ist jedoch nicht durch eine Störung des Zellzyklus erklärbar.

6.2.5 KIF7 beeinflusst die Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli und die Polarität der Zelle

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass *KIF7* die Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli beeinflusst. RPE-1 Zellen zeigten nach *knockdown* von *KIF7* oder nach Transfektion von *KIF7* DN eine erhöhte Acetylierung von Mikrotubuli im Vergleich zu Kontrollzellen. Diese

acetylierten Mikrotubuli waren, anders als nicht-acetylierte Mikrotubuli, resistent gegen Depolymerisierung durch Kältebehandlung. Eine Verbindung zwischen stabilisierten Mikrotubuli und Tubulinacetylierung wurde bereits beschrieben^{150,151}. Das Mikrotubuli-Netzwerk schien also aufgrund der Hyperacetylierung stabilisiert zu sein. Somit könnte man KIF7 eine destabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli zuschreiben. Positiv ausgedrückt, könnte KIF7 die Dynamik von Mikrotubuli erhöhen. Die Acetylierung von Mikrotubuli hat weitere Effekte auf zelluläre Funktionen (zusammengefasst in^{266,267}). Zum Beispiel hat der Acetylierungsstatus eine Auswirkung auf neurodegenerativen Erkrankungen und der neuronalen Differenzierung. Eine gestörte Tubulinacetylierung beeinflusst nicht nur die neuronale Funktion¹⁵², es wird sogar vermutet, dass dadurch die Huntington-Krankheit (HK) und die PK verursacht werden^{153,268,269}. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an acetyliertem Tubulin und somit der Vesikeltransport in HK Patienten reduziert ist, und dass beides durch die Behandlung mit Trichostatin A (TSA, ein nicht-spezifischer HDAC6-Hemmer) wieder erhöht werden kann¹⁵³. Des Weiteren spielt die Acetylierung von Mikrotubuli für die Funktion von subzellulären Organellen, dem vesikulären Transport, verschiedenen Signaltransduktionswegen und die Proliferation von Zellen eine Rolle. Der Golgi Apparat zeigt sowohl eine starke Interaktion mit acetylierten Mikrotubuli^{270,271}, als auch die Fähigkeit diese zu verankern, zu stabilisieren und frühe Acetylierung zu beeinflussen¹⁰⁴. Dafür benötigt der Golgi Apparat das Mikrotubulus-bindende Protein CLASP²⁷², dessen Abwesenheit in Zellen zur Fragmentierung des Golgi Apparats²⁷³, ähnlich dem Golgi Phänotyp in *KIF7 knockdown* Zellen.

Die wahrscheinlichste Verbindung zwischen KIF7 und dessen Einfluss auf die Tubulinacetylierung ist die Interaktion von KIF7 mit der Histondeacetylase HDAC6. HDAC6 ist neben SIRT2 die einzige bisher identifizierte Tubulin-Deacetylase¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. HDAC6 wurde bereits durch BBIP10, ein Ziliopathieprotein aus dem BBSome-Komplex, mit der Regulation der Acetylierung von zytoplasmatischen Mikrotubuli in Verbindung gebracht²⁷⁴. BBIP10 interagiert mit HDAC6 und wird, genau wie das anterograde Kinesin KIF17²⁷⁵ und im Gegensatz zu KIF7, für die Acetylierung von Tubulin benötigt²⁷⁴. Für KIF17 wurde eine stabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli beschrieben. KIF17 beeinflusst die Dynamik von Mikrotubuli, die Polymerisationsrate und die Stabilisierung der Mikrotubuli Plusenden, was wiederum einen Effekt auf die Tubulinacetylierung hat²⁷⁵. Eine vergleichbare Wirkung konnte auch für das beim von-Hippel-Lindau-Syndrom betroffene Ziliopathieprotein VHL gezeigt werden. VHL assoziiert und agiert mit Mikrotubuli und mikrotubulären Regulationsproteinen. Außerdem verursacht der Verlust von *VHL* eine Störung der Ziliogenese und hat einen Effekt

auf das orientierte Wachstum von Mikrotubuli²⁷⁶⁻²⁷⁸. Zudem stabilisiert VHL Mikrotubuli²⁷⁹ und VHL beeinflusst die Dynamik von Mikrotubuli²⁸⁰. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Zilien, z.B. durch den *knockdown* von *IFT88* oder *KIF3A*, eine verstärkte Tubulinacetylierung hervorruft²⁸¹. Diese Hyperacetylierung von Mikrotubuli ist sowohl mit einer veränderten Mikrotubulistabilität als auch mit einer gesteigerten Aktivität von α -Tubulin-Acetyltransferasen assoziiert. Auch in Nierenproben von Patienten mit autosomal-rezessiver polyzystischer Nierenerkrankung (ARPKD) konnte dieser Effekt auf Mikrotubuli nachgewiesen werden²⁸¹. Zusammenfassend wäre vorstellbar, dass KIF7 HDAC6 an das Plusende von Mikrotubuli transportiert, wo HDAC6 diese deacetyliert. Durch den *knockdown* von *KIF7* kommt es somit zu einem Anstieg an acetyliertem Tubulin in der Zelle und einer erhöhten Stabilität von Mikrotubuli.

Des Weiteren zeigten *KIF7 knockdown* RPE-1 Zellen eine stark veränderte Zellform und auch Zellgröße. *KIF7* interagiert selektiv mit PAR3 aus dem Par-Polaritätskomplex, nicht aber mit PAR6 oder APKC. Der Par-Polaritätskomplex (zusammengefasst in²⁸²) im Säugetier besteht aus den Proteinen *partitioning defective-3* (PAR3), *partitioning defective-6* (PAR6), and *atypical protein kinase C* (APKC)^{283,284}. Genetische Studien in *C. elegans* lieferten wichtige Einblicke in den Mechanismus der asymmetrischen Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle^{285,286}. Der Phänotyp in *KIF7 knockdown* Zellen lässt einen Einfluss von *KIF7* auf die Polarität der Zelle vermuten. Auch für *KIF3A* wurde bereits eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beschrieben. Der *knockdown* von *KIF3A* führte ebenfalls zu einer vergrößerten Zellgröße und dem Verlust der Zellpolarität²⁸⁷. Genau wie *KIF7* interagiert *KIF3A* mit der Coiled-Coil Domäne von PAR3²⁸⁸. Auch der *knockdown* von *PAR3*, welches zusammen mit den anderen Polaritätskomplexproteinen PAR6 und APKC u.a. in Zilien lokalisieren²⁸⁹, führt zu Defekten bei der Ziliogenese²⁸⁸. VHL, das auch im Zusammenhang mit Ziliogenese^{276,277} und Mikrotubulistabilität²⁷⁹ steht, interagiert mit dem Polaritätskomplexprotein PAR6²⁷⁸, welches ein Hauptregler von Mikrotubulus-Cortex Interaktionen und dem koordinierten Wachstum von kortikalen Mikrotubuli ist²⁹⁰. Ein möglicher Mechanismus für die Rolle von *KIF7* in der Zellpolarität könnte sein, dass *KIF7* den Par-Polaritätskomplex entlang von Mikrotubuli Richtung Zellmembran transportiert, wo die Polaritätsproteine dann die Aufrechterhaltung der Zellpolarität regulieren. Außerdem sorgt der Par-Polaritätskomplex am Plusende der Mikrotubuli für ein koordiniertes Wachstum von Mikrotubuli. Der *knockdown* von *KIF7* geht somit sowohl mit einer gestörten Zellpolarität als auch mit unkoordiniertem Mikrotubuliwachstum einher. Um diese Fragestellung weiter zu

verfolgen, wären z.B. Immunfluoreszenzfärbungen von Kontrollzellen und *KIF7 knockdown* Zellen gegen die verschiedenen Komponenten des Par-Polaritätskomplexes hilfreich.

6.3 KIF7 spielt eine Rolle in der Zellmigration und der Zellteilung

In einem Migrationsassay zeigten *KIF7 knockdown* RPE-1 Zellen eine deutlich herabgesetzte Fähigkeit zur Migration. Gerichtete Zellmigration ist für viele physiologische Prozesse wie z.B. embryonale Entwicklung, Angiogenese, Immunkontrolle, Wundheilung und Tumordinvasion essentiell²⁹¹⁻²⁹³. Verschiedene Ursachen können für eine defekte Migrationsfähigkeit von Zellen verantwortlich sein. Eine funktionierende Zellpolarität ist sowohl für die persistierende als auch die gerichtete Zellmigration wichtig^{294,295}. Somit wäre eine gestörte Zellpolarität in *KIF7 knockdown* Zellen eine plausible Erklärung für die beobachtete Störung der gerichteten Zellmigration. Außerdem ist eine regulierte Balance zwischen Mikrotubulistabilität und -dynamik entscheidend für eine funktionierende Migration der Zelle²⁹⁶⁻²⁹⁸. Die veränderte Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli in *KIF7 knockdown* Zellen könnten ebenfalls der gestörten Migration zu Grunde liegen. Ein weiterer Prozess, der die Migration einer Zelle beeinflusst, ist die Proliferation. Um einen Effekt von KIF7 auf die Zellteilung zu untersuchen, wurden Durchflusszytometrie Analysen durchgeführt. Dazu wurden humane Osteosarkomazellen (U2OS) verwendet, da diese besser regulierte Zellzyklus-Checkpoints haben als HEK293T Zellen, aber weniger anfällig sind für unspezifische Effekte als RPE-1 Zellen. Zudem ist *KIF7* in diesen Zellen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Der Zellzyklus teilt sich in vier Phasen auf¹⁹³. Auf die Mitose (Kernteilung) folgen die Phasen G₁, S (Synthese) und G₂²⁹⁹. Die letzten drei werden auch als Interphase zusammengefasst. In der G₁-Phase werden Zellbestandteile wie Zytoplasma oder Zellorganellen neu gebildet. In der S-Phase werden die einfachen Chromatiden aus der Mitose repliziert. In der G₂-Phase bereitet sich die Zelle auf die bevorstehende Mitose vor. Dazu rundet sich die Zelle ab und vergrößert sich durch Flüssigkeitsaufnahme. In der M-Phase findet die Teilung der Zelle statt. Einige Zellorganellen, wie z.B. der Golgi Apparat und das ER, fragmentieren bereits in der G₂-Phase und werden in der M-Phase gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt. Nach der Zellteilung gehen einige Zellen in eine Ruhephase (G₀) und differenzieren aus. Auch Zilien werden in dieser Phase gebildet³⁰⁰. Um erneut in die Mitose eintreten zu können, muss das Zilium resorbiert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass eine defekte Ziliogenese Auswirkungen auf die Proliferationsrate von Zellen hat³⁰¹.

Im Fall des *KIF7 knockdowns* scheint der Kausalzusammenhang zwischen Ziliogenesdefekt und Zellzyklusstörungen vermutlich in gegengesetzter Richtung zu verlaufen. Die Durchflusszytometrie Analyse zeigte eine Verschiebung der Zellen in Richtung G₂/M-Phase, was bedeuten würde, dass die Zelle nach abgeschlossener G₂-Phase nicht in der Lage ist, sich zu teilen. Somit kann sie auch nicht in die G₀-Phase übergehen und ein Zilium ausbilden. Eine wahrscheinliche Ursache für den Zellzyklusdefekt könnte hier die Hyperacetylierung und Hyperstabilisierung der Mikrotubuli darstellen. Außerdem würde dies auch viele der äußerlichen Phänotypen von *KIF7 knockdown* Zellen erklären. *KIF7 knockdown* RPE-1 Zellen haben neben einer abnormalen abgerundeten Zellform und erhöhten Zellgröße auch teilweise einen vergrößerten Zellkern. Diese und auch die anderen Phänotypen (Duplikation von Zentrosomen, Reduktion von zilierten Zellen) passen zu der Annahme eines Abbruchs des Zellzyklus in der G₂/M-Phase. Die DNA wurde bereits verdoppelt, es liegen zwei Zentrosomen vor, die Zelle hat sich abgerundet und vergrößert, aber die Zelle ist nicht in der Lage in die Mitose überzugehen und sich zu teilen. Vielleicht ist KIF7 an der korrekten Positionierung der Zentrosomen und/oder der Ausbildung des Spindelapparats beteiligt. In *KIF7 knockdown* Zellen wurden die duplizierten Zentrosomen nur in unmittelbarer Nähe zueinander gefunden, nie jedoch an potentiell gegenüberliegenden Positionen um den Nukleus. Diese Rolle konnte bereits für Xklp2, ein Plusende-gerichtetes Kinesin-ähnliches Protein der Kinesin-12 Familie in dem Modellorganismus *Xenopus laevis*, gezeigt werden. Xklp2 lokalisiert an Zentrosomen während des gesamten Zellzyklus und ist essentiell für eine korrekte Trennung der Zentrosomen in der Prophase der Mitose³⁰².

6.4 Modell der zellulären Funktionen von KIF7

Die Erkenntnisse aus dieser und früheren Arbeiten führen zu folgenden Schlussfolgerungen. KIF7 ist ein neues JBTS-verursachendes Gen und reiht sich somit in die immer länger werdende Liste der Ziliopathiegene ein. KIF7 als potentiell anterograd-gerichtetes Kinesin²¹⁶ könnte das Tubulin-deacetylierende Protein HDAC6 entlang der Mikrotubuli transportieren, wo die Acetylierung bzw. Deacetylierung von Tubulin stattfindet. Wenn kein funktionierendes KIF7 mehr in der Zelle ist (durch *KIF7 knockdown* oder Verdrängung des endogenen KIF7s durch KIF7 DN), wird HDAC6 nicht mehr korrekt transportiert. Es kommt zu einem Anstieg an acetyliertem Tubulin und einer Hyperstabilisierung von Mikrotubuli. Der Acetylierungsstatus von Mikrotubuli wiederum beeinflusst vermutlich die Bindefähigkeit von Motorproteinen an Mikrotubuli^{135,152–154}, wodurch eine veränderte Funktionalität von anderen

Kinesin verursacht werden kann. Dabei scheint die N-terminale Motordomäne essentiell für die Funktionalität von KIF7 zu sein. Diese Daten deuten auf eine Rolle von KIF7 in der Regulation von Tubulinacetylierung und -stabilisierung hin. Somit lassen sich möglicherweise auch andere zelluläre Phänotypen der vorliegenden Arbeit erklären. Es wurde bereits gezeigt, dass eine fehlerhafte Dynamik von Mikrotubuli eine Fragmentierung des Golgi Apparats^{262,303}, Ziliogenesedefekte²⁷⁴ und eine veränderte Zellmorphologie verursachen kann. Außerdem scheint die korrekte Funktion von KIF7 für die durch den Par-Polaritätskomplex gesteuerte Zellpolarität eine Rolle zu spielen. Möglicherweise ist unter anderem KIF7 für den Transport des Par-Polaritätskomplexes an die Zellmembran zuständig. Für ein orientiertes und koordiniertes Mikrotubuluswachstum ist das Par-Polaritätskomplexprotein PAR6 einer der Hauptregler²⁹⁰. Somit ist ein Mechanismus vorstellbar, bei dem der Verlust von KIF7 in der Zelle zu einem unorientierten und unkoordinierten Mikrotubuluswachstum führt, da der Par-Polaritätskomplex am Plusende von Mikrotubuli und somit die Regulation des Wachstums verloren geht. Die Defekte in der Ziliogenese können entweder eine Folge des ungeordneten und unkoordinierten Wachstums von Mikrotubuli in *KIF7 knockdown* Zellen sein, denn eine geordnete Regulation der Mikrotubuliorientierung ist eine vermeintliche Voraussetzung für die Ziliogenese, oder eine Konsequenz aus dem Abbruch des Zellzyklus in der G₂/M-Phase, der sich in *KIF7 knockdown* Zellen zeigt.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten lassen die Frage zu, ob das JBTS als Resultat einer *KIF7* Mutation überhaupt der Gruppe der Ziliopathien zuzuordnen ist. Laut Definition sind Ziliopathien genetische Erkrankungen, die durch Struktur- und/oder Funktionsdefekten von Zilien entstehen. Der ziliäre Phänotyp, der sich aufgrund des Verlustes von funktionalem KIF7 in der Zelle ergibt, scheint neben dem Golgi- und dem Zentrosomendefekt allerdings nur eine sekundäre Erscheinung einer übergeordneten Problematik von veränderten Tubulusdynamik und -stabilität und Zellpolarität zu sein. Daher könnte ein anderer Pathomechanismus als der einer klassischen Ziliopathie vermutet werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Brancati F, Dallapiccola B, Valente EM. Joubert Syndrome and related disorders. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:20. doi:10.1186/1750-1172-5-20.
2. Joubert M, Eisenring JJ, Robb JP, Andermann F. Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation. *Neurology.* 1969;19(9):813-825.
3. Boltshauser E, Isler W. Joubert syndrome: episodic hyperpnea, abnormal eye movements, retardation and ataxia, associated with dysplasia of the cerebellar vermis. *Neuropadiatrie.* 1977;8(1):57-66. doi:10.1055/s-0028-1091505.
4. Maria BL, Hoang KBN, Tusa RJ, et al. "Joubert Syndrome" Revisited: Key Ocular Motor Signs With Magnetic Resonance Imaging Correlation. *J Child Neurol.* 1997;12(7):423-430. doi:10.1177/088307389701200703.
5. Maria BL, Quisling RG, Rosainz LC, et al. Molar Tooth Sign in Joubert Syndrome: Clinical, Radiologic, and Pathologic Significance. *J Child Neurol.* 1999;14(6):368-376. doi:10.1177/088307389901400605.
6. Parisi MA. Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2009;151C(4):326-340. doi:10.1002/ajmg.c.30229.
7. OMIM Home. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Accessed January 2, 2013.
8. Bielas SL, Silhavy JL, Brancati F, et al. Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidylinositol signaling to the ciliopathies. *Nat Genet.* 2009;41(9):1032-1036. doi:10.1038/ng.423.
9. Valente EM, Logan CV, Mougou-Zerelli S, et al. Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. *Nat Genet.* 2010;42(7):619-625. doi:10.1038/ng.594.
10. Edvardson S, Shaag A, Zenvirt S, et al. Joubert syndrome 2 (JBTS2) in Ashkenazi Jews is associated with a TMEM216 mutation. *Am J Hum Genet.* 2010;86(1):93-97. doi:10.1016/j.ajhg.2009.12.007.
11. Lee JH, Silhavy JL, Lee JE, et al. Evolutionarily Assembled cis-Regulatory Module at a Human Ciliopathy Locus. *Science.* 2012;335(6071):966-969. doi:10.1126/science.1213506.
12. Ferland RJ, Eyaid W, Collura RV, et al. Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in AHI1 in Joubert syndrome. *Nat Genet.* 2004;36(9):1008-1013. doi:10.1038/ng1419.
13. Dixon-Salazar T, Silhavy JL, Marsh SE, et al. Mutations in the AHI1 gene, encoding jouberin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. *Am J Hum Genet.* 2004;75(6):979-987. doi:10.1086/425985.
14. Eley L, Gabrielides C, Adams M, Johnson CA, Hildebrandt F, Sayer JA. Jouberin localizes to collecting ducts and interacts with nephrocystin-1. *Kidney International.* 2008;74(9):1139-1149. doi:10.1038/ki.2008.377.

15. Parisi MA, Bennett CL, Eckert ML, et al. The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):82-91. doi:10.1086/421846.
16. Otto EA, Schermer B, Obara T, et al. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nature Genetics.* 2003;34(4):413-420. doi:10.1038/ng1217.
17. Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, et al. Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet.* 2006;38(6):623-625. doi:10.1038/ng1805.
18. Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, et al. The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet.* 2006;38(6):674-681. doi:10.1038/ng1786.
19. Baala L, Romano S, Khaddour R, et al. The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007;80(1):186-194. doi:10.1086/510499.
20. Arts HH, Doherty D, van Beersum SEC, et al. Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat Genet.* 2007;39(7):882-888. doi:10.1038/ng2069.
21. Delous M, Baala L, Salomon R, et al. The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet.* 2007;39(7):875-881. doi:10.1038/ng2039.
22. Cantagrel V, Silhavy JL, Bielas SL, et al. Mutations in the Cilia Gene ARL13B Lead to the Classical Form of Joubert Syndrome. *The American Journal of Human Genetics.* 2008;83(2):170-179. doi:10.1016/j.ajhg.2008.06.023.
23. Gorden NT, Arts HH, Parisi MA, et al. CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290. *Am J Hum Genet.* 2008;83(5):559-571. doi:10.1016/j.ajhg.2008.10.002.
24. Coene KLM, Roepman R, Doherty D, et al. OFD1 is mutated in X-linked Joubert syndrome and interacts with LCA5-encoded lebercilin. *Am J Hum Genet.* 2009;85(4):465-481. doi:10.1016/j.ajhg.2009.09.002.
25. Field M, Scheffer IE, Gill D, et al. Expanding the molecular basis and phenotypic spectrum of X-linked Joubert syndrome associated with OFD1 mutations. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(7):806-809. doi:10.1038/ejhg.2012.9.
26. Davis EE, Zhang Q, Liu Q, et al. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nature Genetics.* 2011;43(3):189-196. doi:10.1038/ng.756.
27. Tran PV, Haycraft CJ, Besschetnova TY, et al. THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nature Genetics.* 2008;40(4):403-410. doi:10.1038/ng.105.
28. Dafinger C, Liebau MC, Elsayed SM, et al. Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2662-2667. doi:10.1172/JCI43639.

29. Putoux A, Thomas S, Coene KLM, et al. KIF7 mutations cause fetal hydrolethalus and acrocallosal syndromes. *Nat Genet.* 2011;43(6):601-606. doi:10.1038/ng.826.
30. Liem KF Jr, He M, Ocbina PJR, Anderson KV. Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(32):13377-13382. doi:10.1073/pnas.0906944106.
31. Reiter JF, Skarnes WC. Tectonic, a novel regulator of the Hedgehog pathway required for both activation and inhibition. *Genes Dev.* 2006;20(1):22-27. doi:10.1101/gad.1363606.
32. Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, et al. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet.* 2011;43(8):776-784. doi:10.1038/ng.891.
33. Huang L, Szymanska K, Jensen VL, et al. TMEM237 is mutated in individuals with a Joubert syndrome related disorder and expands the role of the TMEM family at the ciliary transition zone. *Am J Hum Genet.* 2011;89(6):713-730. doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.005.
34. Lee JE, Silhavy JL, Zaki MS, et al. CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nat Genet.* 2012;44(2):193-199. doi:10.1038/ng.1078.
35. Srour M, Schwartzenuber J, Hamdan FF, et al. Mutations in C5ORF42 cause Joubert syndrome in the French Canadian population. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):693-700. doi:10.1016/j.ajhg.2012.02.011.
36. Thomas S, Legendre M, Saunier S, et al. TCTN3 Mutations Cause Mohr-Majewski Syndrome. *The American Journal of Human Genetics.* 2012;91(2):372-378. doi:10.1016/j.ajhg.2012.06.017.
37. Sang L, Miller JJ, Corbit KC, et al. Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell.* 2011;145(4):513-528. doi:10.1016/j.cell.2011.04.019.
38. Van Leeuwenhoek A. Concerning little animals observed in rain-, well-, sea- and snow-water; as also in water wherein papper had lain infused. *Philos Trans Lond.* 1677;12:821-31.
39. Primary Cilia resource. Where are primary cilia found? Available at: <http://www.bowserlab.org/primarycilia/cilialist.html>. Accessed August 7, 2012.
40. Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2002;3(11):813-825. doi:10.1038/nrm952.
41. Bornens M. The centrosome in cells and organisms. *Science.* 2012;335(6067):422-426. doi:10.1126/science.1209037.
42. Kobayashi T, Dynlacht BD. Regulating the transition from centriole to basal body. *J Cell Biol.* 2011;193(3):435-444. doi:10.1083/jcb.201101005.
43. Bloodgood RA. Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *J Cell Sci.* 2010;123(4):505-509. doi:10.1242/jcs.066308.

44. Basu B, Brueckner M. Chapter Six Cilia: Multifunctional Organelles at the Center of Vertebrate Left–Right Asymmetry. In: Bradley K. Yoder, ed. *Current Topics in Developmental Biology*. Vol Volume 85. Academic Press; 2008:151-174. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215308008065>. Accessed November 14, 2012.
45. Snell WJ, Pan J, Wang Q. Cilia and Flagella Revealed: From Flagellar Assembly in *Chlamydomonas* to Human Obesity Disorders. *Cell*. 2004;117(6):693-697. doi:10.1016/j.cell.2004.05.019.
46. Pan J, Wang Q, Snell WJ. Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Laboratory Investigation*. 2005;85(4):452-463. doi:10.1038/labinvest.3700253.
47. Pazour GJ, Witman GB. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(1):105-110.
48. Bijlsma MF, Spek CA, Peppelenbosch MP. Hedgehog: an unusual signal transducer. *Bioessays*. 2004;26(4):387-394. doi:10.1002/bies.20007.
49. Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*. 2004;304(5678):1755-1759. doi:10.1126/science.1098020.
50. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(4):306-317. doi:10.1038/nrm1612.
51. Kessel RG. *Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*. San Francisco: W. H. Freeman; 1979.
52. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics*. 2003;33(2):129-137. doi:10.1038/ng1076.
53. Praetorius HA, Spring KR. Removal of the MDCK Cell Primary Cilium Abolishes Flow Sensing. *J Membrane Biol*. 2003;191(1):69-76. doi:10.1007/s00232-002-1042-4.
54. Praetorius HA, Spring KR. The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12(5):517-520. doi:10.1097/01.mnh.0000088730.87142.d1.
55. Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(32):11325-11330. doi:10.1073/pnas.0505328102.
56. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DYR, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*. 2005;437(7061):1018-1021. doi:10.1038/nature04117.
57. Schneider L, Clement CA, Teilmann SC, et al. PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol*. 2005;15(20):1861-1866. doi:10.1016/j.cub.2005.09.012.
58. Simons M, Gloy J, Ganner A, et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet*. 2005;37(5):537-543. doi:10.1038/ng1552.

59. Sfakianos J, Togawa A, Maday S, et al. Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 2007;179(6):1133-1140. doi:10.1083/jcb.200709111.
60. Avasthi P, Marshall WF. Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation.* 2012;83(2):S30-42. doi:10.1016/j.diff.2011.11.015.
61. Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, et al. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics.* 1995;28(1):44-51.
62. Katoh Y, Katoh M. Identification and characterization of rat Desert hedgehog and Indian hedgehog genes in silico. *Int J Oncol.* 2005;26(2):545-549.
63. Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on Sonic hedgehog orthologs. *Oncol Rep.* 2005;14(4):1087-1090.
64. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(12):903-911. doi:10.1038/nrc1229.
65. Briscoe J, Théron P. Hedgehog signaling: from the *Drosophila* cuticle to anti-cancer drugs. *Dev Cell.* 2005;8(2):143-151.
66. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(10):1050-1054.
67. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science.* 1996;272(5268):1668-1671.
68. Carpenter D, Stone DM, Brush J, et al. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(23):13630-13634.
69. Xie J, Murone M, Luoh SM, et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature.* 1998;391(6662):90-92. doi:10.1038/34201.
70. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature.* 2002;418(6900):892-897. doi:10.1038/nature00989.
71. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science.* 1987;236(4797):70-73.
72. Price MA. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev.* 2006;20(4):399-410. doi:10.1101/gad.1394306.
73. Ho KS, Suyama K, Fish M, Scott MP. Differential regulation of Hedgehog target gene transcription by Costal2 and Suppressor of Fused. *Development.* 2005;132(6):1401-1412. doi:10.1242/dev.01689.
74. Østerlund T, Everman DB, Betz RC, et al. The FU gene and its possible protein isoforms. *BMC Genomics.* 2004;5(1):49. doi:10.1186/1471-2164-5-49.
75. Taylor MD, Liu L, Raffel C, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet.* 2002;31(3):306-310. doi:10.1038/ng916.

76. Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, et al. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5548-5555. doi:10.1074/jbc.M105708200.
77. Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, et al. Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell*. 2006;124(1):47-59. doi:10.1016/j.cell.2005.10.042.
78. Kasper M, Schnidar H, Neill GW, et al. Selective modulation of Hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. *Mol Cell Biol*. 2006;26(16):6283-6298. doi:10.1128/MCB.02317-05.
79. Ruat M, Roudaut H, Ferent J, Traiffort E. Hedgehog trafficking, cilia and brain functions. *Differentiation*. 2012;83(2):S97-S104. doi:10.1016/j.diff.2011.11.011.
80. Barr MM, Sternberg PW. A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*. *Nature*. 1999;401(6751):386-389. doi:10.1038/43913.
81. Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, et al. Chlamydomonas IFT88 and Its Mouse Homologue, Polycystic Kidney Disease Gene Tg737, Are Required for Assembly of Cilia and Flagella. *J Cell Biol*. 2000;151(3):709-718. doi:10.1083/jcb.151.3.709.
82. Pazour GJ. Intraflagellar Transport and Cilia-Dependent Renal Disease: The Ciliary Hypothesis of Polycystic Kidney Disease. *JASN*. 2004;15(10):2528-2536. doi:10.1097/01.ASN.0000141055.57643.E0.
83. Hildebrandt F, Otto E. Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(12):928-940. doi:10.1038/nrg1727.
84. Wilson PD. Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(10):1868-1873. doi:10.1016/j.biocel.2004.03.012.
85. Harris PC. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Clues to Pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 1999;8(10):1861-1866. doi:10.1093/hmg/8.10.1861.
86. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell*. 1994;77(6):881-894. doi:10.1016/0092-8674(94)90137-6.
87. Davenport JR, Watts AJ, Roper VC, et al. Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol*. 2007;17(18):1586-1594. doi:10.1016/j.cub.2007.08.034.
88. Lin F, Hiesberger T, Cordes K, et al. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(9):5286-5291. doi:10.1073/pnas.0836980100.
89. Benzing T, Schermer B. Aktuelle Erkenntnisse zur Pathogenese zystischer Nierenerkrankungen. *NephroNews*. 2011.
90. Benzing T. Familiäre Zystennierenerkrankungen: Aktuelle Erkenntnisse zur Pathogenese der ADPKD. *NephroNews*. 2013.

91. Schermer PDB, Benzing T. Aktuelle Erkenntnisse zur Pathogenese der ADPKD. *Nephrologe*. 2010;5(5):364-374. doi:10.1007/s11560-010-0419-0.
92. Conduit SE, Dyson JM, Mitchell CA. Inositol polyphosphate 5-phosphatases; new players in the regulation of cilia and ciliopathies. *FEBS Letters*. (0). doi:10.1016/j.febslet.2012.07.037.
93. Sattar S, Gleeson JG. The ciliopathies in neuronal development: a clinical approach to investigation of Joubert syndrome and Joubert syndrome-related disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2011;53(9):793-798. doi:10.1111/j.1469-8749.2011.04021.x.
94. Tallila J, Jakkula E, Peltonen L, Salonen R, Kestilä M. Identification of CC2D2A as a Meckel syndrome gene adds an important piece to the ciliopathy puzzle. *Am J Hum Genet*. 2008;82(6):1361-1367. doi:10.1016/j.ajhg.2008.05.004.
95. Frank V, den Hollander AI, Brüchele NO, et al. Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. *Hum Mutat*. 2008;29(1):45-52. doi:10.1002/humu.20614.
96. Poretti A, Dietrich Alber F, Brancati F, Dallapiccola B, Valente EM, Boltshauser E. Normal cognitive functions in joubert syndrome. *Neuropediatrics*. 2009;40(6):287-290. doi:10.1055/s-0030-1249630.
97. Jacoby M, Cox JJ, Gayral S, et al. INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nat Genet*. 2009;41(9):1027-1031. doi:10.1038/ng.427.
98. Badano JL, Leitch CC, Ansley SJ, et al. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*. 2006;439(7074):326-330. doi:10.1038/nature04370.
99. Hoefele J, Wolf MTF, O'Toole JF, et al. Evidence of Oligogenic Inheritance in Nephronophthisis. *JASN*. 2007;18(10):2789-2795. doi:10.1681/ASN.2007020243.
100. Tory K, Lacoste T, Burglen L, et al. High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(5):1566-1575. doi:10.1681/ASN.2006101164.
101. Hildebrandt F. Genetic kidney diseases. *Lancet*. 2010;375(9722):1287-1295. doi:10.1016/S0140-6736(10)60236-X.
102. Cleveland DW, Kirschner MW, Cowan NJ. Isolation of separate mRNAs for α - and β -Tubulin and characterization of the corresponding in vitro translation products. *Cell*. 1978;15(3):1021-1031. doi:10.1016/0092-8674(78)90286-6.
103. Lüders J, Stearns T. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):161-167. doi:10.1038/nrm2100.
104. Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, et al. The Golgi Complex Is a Microtubule-organizing Organelle. *Mol Biol Cell*. 2001;12(7):2047-2060.
105. Desai A, Mitchison TJ. Microtubule Polymerization Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997;13(1):83-117. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.83.

106. Burbank KS, Mitchison TJ. Microtubule dynamic instability. *Current Biology*. 2006;16(14):R516-R517. doi:10.1016/j.cub.2006.06.044.
107. Nogales E. Structural Insights into Microtubule Function. *Annual Review of Biochemistry*. 2000;69(1):277-302. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.277.
108. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 1984;312(5991):237-242.
109. Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(4):309-322. doi:10.1038/nrm2369.
110. Jaworski J, Hoogenraad CC, Akhmanova A. Microtubule plus-end tracking proteins in differentiated mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40(4):619-637. doi:10.1016/j.biocel.2007.10.015.
111. Galjart N. CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(6):487-498. doi:10.1038/nrm1664.
112. Barth AIM, Caro-Gonzalez HY, Nelson WJ. Role of adenomatous polyposis coli (APC) and microtubules in directional cell migration and neuronal polarization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2008;19(3):245-251. doi:10.1016/j.semcdb.2008.02.003.
113. Nakamura M, Zhou XZ, Lu KP. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Current Biology*. 2001;11(13):1062-1067. doi:10.1016/S0960-9822(01)00297-4.
114. Zumbunn J, Kinoshita K, Hyman AA, Näthke IS. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 β phosphorylation. *Current Biology*. 2001;11(1):44-49. doi:10.1016/S0960-9822(01)00002-1.
115. Akhmanova A, Hoogenraad CC, Drabek K, et al. CLASPs Are CLIP-115 and -170 Associating Proteins Involved in the Regional Regulation of Microtubule Dynamics in Motile Fibroblasts. *Cell*. 2001;104(6):923-935. doi:10.1016/S0092-8674(01)00288-4.
116. Mimori-Kiyosue Y, Grigoriev I, Lansbergen G, et al. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol*. 2005;168(1):141-153. doi:10.1083/jcb.200405094.
117. Sapir T, Elbaum M, Reiner O. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J*. 1997;16(23):6977-6984. doi:10.1093/emboj/16.23.6977.
118. Coquelle FM, Caspi M, Cordelières FP, et al. LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway. *Mol Cell Biol*. 2002;22(9):3089-3102. doi:10.1128/MCB.22.9.3089-3102.2002.
119. Fukata M, Watanabe T, Noritake J, et al. Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 2002;109(7):873-885. doi:10.1016/S0092-8674(02)00800-0.

120. Watanabe T, Wang S, Noritake J, et al. Interaction with IQGAP1 Links APC to Rac1, Cdc42, and Actin Filaments during Cell Polarization and Migration. *Developmental Cell*. 2004;7(6):871-883. doi:10.1016/j.devcel.2004.10.017.
121. Wen Y, Eng CH, Schmoranzer J, et al. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature Cell Biology*. 2004;6(9):820-830. doi:10.1038/ncb1160.
122. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(12):773-786. doi:10.1038/nrm3227.
123. Wilson PG, Borisy GG. Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *Bioessays*. 1997;19(6):451-454. doi:10.1002/bies.950190603.
124. Janke C, Kneussel M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends in Neurosciences*. 2010;33(8):362-372. doi:10.1016/j.tins.2010.05.001.
125. Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;4(12):938-948. doi:10.1038/nrm1260.
126. Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle*. 2007;6(17):2152-2160.
127. Ludueña RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol*. 1998;178:207-275.
128. Barra HS, Arce CA, Argaraña CE. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol*. 1988;2(2):133-153.
129. MacRae TH. Tubulin Post-Translational Modifications. Enzymes and Their Mechanisms of Action. *European Journal of Biochemistry*. 1997;244(2):265-278. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00265.x.
130. Ozols J, Caron JM. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Mol Biol Cell*. 1997;8(4):637-645.
131. L'Hernault SW, Rosenbaum JL. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry*. 1985;24(2):473-478.
132. L'Hernault SW, Rosenbaum JL. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly. *J Cell Biol*. 1983;97(1):258-263. doi:10.1083/jcb.97.1.258.
133. Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol*. 1986;103(2):571-579.
134. Gaertig J, Cruz MA, Bowen J, Gu L, Pennock DG, Gorovsky MA. Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Biol*. 1995;129(5):1301-1310. doi:10.1083/jcb.129.5.1301.

135. Hammond JW, Huang C-F, Kaech S, Jacobson C, Banker G, Verhey KJ. Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons. *Mol Biol Cell*. 2010;21(4):572-583. doi:10.1091/mbc.E09-01-0044.
136. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 1998;391(6663):199-203. doi:10.1038/34465.
137. Nogales E. A structural view of microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999;56(1):133-142. doi:10.1007/s000180050012.
138. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009;325(5942):834-840. doi:10.1126/science.1175371.
139. Chu C-W, Hou F, Zhang J, et al. A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol Biol Cell*. 2011;22(4):448-456. doi:10.1091/mbc.E10-03-0203.
140. Shida T, Cueva JG, Xu Z, Goodman MB, Nachury MV. The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(50):21517-21522. doi:10.1073/pnas.1013728107.
141. Akella JS, Wloga D, Kim J, et al. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature*. 2010;467(7312):218-222. doi:10.1038/nature09324.
142. Ohkawa N, Sugisaki S, Tokunaga E, et al. N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells*. 2008;13(11):1171-1183. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01235.x.
143. Solinger JA, Paolinelli R, Klöß H, et al. The *Caenorhabditis elegans* Elongator Complex Regulates Neuronal α -tubulin Acetylation. *PLoS Genet*. 2010;6(1):e1000820. doi:10.1371/journal.pgen.1000820.
144. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert M-L, et al. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell*. 2009;136(3):551-564. doi:10.1016/j.cell.2008.11.043.
145. Conacci-Sorrell M, Ngouenet C, Eisenman RN. Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell*. 2010;142(3):480-493. doi:10.1016/j.cell.2010.06.037.
146. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002;417(6887):455-458. doi:10.1038/417455a.
147. Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, et al. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J*. 2002;21(24):6820-6831. doi:10.1093/emboj/cdf682.
148. Zhang Y, Li N, Caron C, et al. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO Journal*. 2003;22(5):1168-1179. doi:10.1093/emboj/cdg115.
149. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. *Molecular Cell*. 2003;11(2):437-444. doi:10.1016/S1097-2765(03)00038-8.

150. Webster DR, Borisy GG. Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci.* 1989;92(1):57-65.
151. Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci.* 1992;103(4):953-964.
152. Reed NA, Cai D, Blasius TL, et al. Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology.* 2006;16(21):2166-2172. doi:10.1016/j.cub.2006.09.014.
153. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, et al. Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J Neurosci.* 2007;27(13):3571-3583. doi:10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007.
154. Bulinski JC. Microtubule Modification: Acetylation Speeds Anterograde Traffic Flow. *Current Biology.* 2007;17(1):R18-R20. doi:10.1016/j.cub.2006.11.036.
155. Verhey KJ, Hammond JW. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2009;10(11):765-777. doi:10.1038/nrm2782.
156. Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *Journal of Neurobiology.* 2004;58(2):189-200. doi:10.1002/neu.10314.
157. Hirokawa N, Takemura R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature Reviews Neuroscience.* 2005;6(3):201-214. doi:10.1038/nrn1624.
158. Vale RD. The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell.* 2003;112(4):467-480. doi:10.1016/S0092-8674(03)00111-9.
159. Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in Cell Biology.* 2005;15(9):467-476. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.006.
160. Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, et al. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol.* 2004;167(1):19-22. doi:10.1083/jcb.200408113.
161. Hirokawa N. Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science.* 1998;279(5350):519-526. doi:10.1126/science.279.5350.519.
162. Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *PNAS.* 2001;98(13):7004-7011. doi:10.1073/pnas.111145398.
163. Dagenbach EM, Endow SA. A new kinesin tree. *J Cell Sci.* 2004;117(1):3-7. doi:10.1242/jcs.00875.
164. Wordeman L. How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: Lessons from molecular assays. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2010;21(3):260-268. doi:10.1016/j.semcdb.2010.01.018.
165. Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2012;12(8):527-539. doi:10.1038/nrc3310.

166. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(10):682-696. doi:10.1038/nrm2774.
167. Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron*. 2010;68(4):610-638. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.039.
168. Blaineau C, Tessier M, Dubessay P, et al. A Novel Microtubule-Depolymerizing Kinesin Involved in Length Control of a Eukaryotic Flagellum. *Current Biology*. 2007;17(9):778-782. doi:10.1016/j.cub.2007.03.048.
169. Dawson SC, Sagolla MS, Mancuso JJ, et al. Kinesin-13 Regulates Flagellar, Interphase, and Mitotic Microtubule Dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*. 2007;6(12):2354-2364. doi:10.1128/EC.00128-07.
170. Piao T, Luo M, Wang L, et al. A microtubule depolymerizing kinesin functions during both flagellar disassembly and flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(12):4713-4718. doi:10.1073/pnas.0808671106.
171. Kobayashi T, Tsang WY, Li J, Lane W, Dynlacht BD. Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. *Cell*. 2011;145(6):914-925. doi:10.1016/j.cell.2011.04.028.
172. Wang L, Piao T, Cao M, et al. Flagellar regeneration requires cytoplasmic microtubule depolymerization and kinesin-13. *J Cell Sci*. 2013. doi:10.1242/jcs.124255.
173. Niwa S, Nakajima K, Miki H, Minato Y, Wang D, Hirokawa N. KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. *Developmental Cell*. 2012;23(6):1167-1175. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.016.
174. Cole DG, Diener DR, Himelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL. *Chlamydomonas* Kinesin-II-dependent Intraflagellar Transport (IFT): IFT Particles Contain Proteins Required for Ciliary Assembly in *Caenorhabditis elegans* Sensory Neurons. *J Cell Biol*. 1998;141(4):993-1008. doi:10.1083/jcb.141.4.993.
175. Kozminski KG, Beech PL, Rosenbaum JL. The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol*. 1995;131(6):1517-1527. doi:10.1083/jcb.131.6.1517.
176. Ou G, Blacque O, Snow JJ, Leroux MR, Scholey JM. Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature*. 2005;436(7050):583-587. doi:10.1038/nature03818.
177. Patel V, Li L, Cobo-Stark P, et al. Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum Mol Genet*. 2008;17(11):1578-1590. doi:10.1093/hmg/ddn045.
178. Jenkins PM, Hurd TW, Zhang L, et al. Ciliary Targeting of Olfactory CNG Channels Requires the CNGB1b Subunit and the Kinesin-2 Motor Protein, KIF17. *Current Biology*. 2006;16(12):1211-1216. doi:10.1016/j.cub.2006.04.034.
179. Endoh-Yamagami S, Evangelista M, Wilson D, et al. The mammalian Cos2 homolog Kif7 plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. *Curr Biol*. 2009;19(15):1320-1326. doi:10.1016/j.cub.2009.06.046.

180. Kroschewski R, Hall A, Mellman I. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nature Cell Biology*. 1999;1(1):8-13. doi:10.1038/8977.
181. O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet*. 1998;63(1):259-266. doi:10.1086/301904.
182. Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*. 2002;30(1):97-101. doi:10.1038/ng786.
183. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*. 1996;58(6):1347-1363.
184. Thiele H, Nürnberg P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics*. 2005;21(8):1730-1732. doi:10.1093/bioinformatics/bth488.
185. Rüschemdorf F, Nürnberg P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics*. 2005;21(9):2123-2125. doi:10.1093/bioinformatics/bti264.
186. Jansohn M, Aigner A. *Gentechnische Methoden : eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 4th ed. München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.; 2007.
187. Rehm H. *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. 5th ed. Heidelberg; München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl.; 2006.
188. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*. 1971;56(2):341-361.
189. The Nobel Prize in Chemistry 1993. Available at: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/. Accessed October 4, 2012.
190. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-5467.
191. Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M. Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(11):4593-4602.
192. Jagiello P, Gencik M, Arning L, et al. New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum Genet*. 2004;114(5):468-477. doi:10.1007/s00439-004-1092-z.
193. Alberts B, Johnson A, Walter P, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York [etc.]: Garland Science; 2008.
194. Sgaramella V, Van de Sande JH, Khorana HG. Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1970;67(3):1468-1475.

195. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 2000;10(11):1788-1795.
196. Katzen F. Gateway recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2007;2(4):571-589. doi:10.1517/17460441.2.4.571.
197. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(21):7413-7417.
198. Starkuviene V, Liebel U, Simpson JC, et al. High-content screening microscopy identifies novel proteins with a putative role in secretory membrane traffic. *Genome Res.* 2004;14(10A):1948-1956. doi:10.1101/gr.2658304.
199. Zilberstein A, Snider MD, Porter M, Lodish HF. Mutants of vesicular stomatitis virus blocked at different stages in maturation of the viral glycoprotein. *Cell.* 1980;21(2):417-427.
200. Gherman A, Davis EE, Katsanis N. The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet.* 2006;38(9):961-962. doi:10.1038/ng0906-961.
201. CiliaProteome. Available at: <http://www.ciliaproteome.org/>. Accessed October 16, 2012.
202. Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, et al. Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci.* 1995;15(1):477-491.
203. Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL. Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(26):12867-12871.
204. Burstedt MS, Sandgren O, Holmgren G, Forsman-Semb K. Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. *IOVS.* 1999;40(5):995-1000.
205. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:125-148. doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115610.
206. Adams M, Smith UM, Logan CV, Johnson CA. Recent advances in the molecular pathology, cell biology and genetics of ciliopathies. *J Med Genet.* 2008;45(5):257-267. doi:10.1136/jmg.2007.054999.
207. Baala L, Audollent S, Martinovic J, et al. Pleiotropic Effects of CEP290 (NPHP6) Mutations Extend to Meckel Syndrome. *The American Journal of Human Genetics.* 2007;81(1):170-179. doi:10.1086/519494.
208. Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet.* 2008;40(4):443-448. doi:10.1038/ng.97.
209. Den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *The American Journal of Human Genetics.* 2006;79(3):556-561. doi:10.1086/507318.

210. Coppieeters F, Lefever S, Leroy BP, De Baere E. CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Hum Mutat.* 2010;31(10):1097-1108. doi:10.1002/humu.21337.
211. Cantin GT, Yi W, Lu B, et al. Combining Protein-Based IMAC, Peptide-Based IMAC, and MudPIT for Efficient Phosphoproteomic Analysis. *J Proteome Res.* 2008;7(3):1346-1351. doi:10.1021/pr0705441.
212. Doherty D, Parisi MA, Finn LS, et al. Mutations in 3 genes (MKS3, CC2D2A and RPGRIP1L) cause COACH syndrome (Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis). *J Med Genet.* 2010;47(1):8-21. doi:10.1136/jmg.2009.067249.
213. Otto EA, Tory K, Attanasio M, et al. Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). *J Med Genet.* 2009;46(10):663-670. doi:10.1136/jmg.2009.066613.
214. Chen C-P. Meckel Syndrome: Genetics, Perinatal Findings, and Differential Diagnosis. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2007;46(1):9-14. doi:10.1016/S1028-4559(08)60100-X.
215. Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet.* 2008;40(4):443-448. doi:10.1038/ng.97.
216. Klejnot M, Kozielski F. Structural insights into human Kif7, a kinesin involved in Hedgehog signalling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012;68(Pt 2):154-159. doi:10.1107/S0907444911053042.
217. Kinesin-like protein KIF7 - Homo sapiens (Human). Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q2M1P5>. Accessed December 6, 2012.
218. Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N. KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J Cell Biol.* 1995;130(6):1387-1399.
219. Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N. Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(16):8443-8448.
220. Noda Y, Sato-Yoshitake R, Kondo S, Nangaku M, Hirokawa N. KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J Cell Biol.* 1995;129(1):157-167.
221. Saito N, Okada Y, Noda Y, Kinoshita Y, Kondo S, Hirokawa N. KIF2 Is a Novel Neuron-Specific C-Terminal Type Kinesin Superfamily Motor for Dendritic Transport of Multivesicular Body-Like Organelles. *Neuron.* 1997;18(3):425-438. doi:10.1016/S0896-6273(00)81243-X.
222. Sekine Y, Okada Y, Noda Y, et al. A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *J Cell Biol.* 1994;127(1):187-201.

223. Gauci S, Helbig AO, Slijper M, Krijgsveld J, Heck AJR, Mohammed S. Lys-N and Trypsin Cover Complementary Parts of the Phosphoproteome in a Refined SCX-Based Approach. *Anal Chem*. 2009;81(11):4493-4501. doi:10.1021/ac9004309.
224. Mayya V, Lundgren DH, Hwang S-I, et al. Quantitative Phosphoproteomic Analysis of T Cell Receptor Signaling Reveals System-Wide Modulation of Protein-Protein Interactions. *Sci Signal*. 2009;2(84):ra46. doi:10.1126/scisignal.2000007.
225. Cheung HO-L, Zhang X, Ribeiro A, et al. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. *Sci Signal*. 2009;2(76):ra29. doi:10.1126/scisignal.2000405.
226. Vierkotten J, Dildrop R, Peters T, Wang B, R  ther U. Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development*. 2007;134(14):2569-2577. doi:10.1242/dev.003715.
227. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*. 2003;426(6962):83-87. doi:10.1038/nature02061.
228. Hui C, Joyner AL. A mouse model of Greig cephalo-polysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nature Genetics*. 1993;3(3):241-246. doi:10.1038/ng0393-241.
229. Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*. 2000;100(4):423-434.
230. Zhang W, Zhao Y, Tong C, et al. Hedgehog-Regulated Costal2-Kinase Complexes Control Phosphorylation and Proteolytic Processing of Cubitus Interruptus. *Developmental Cell*. 2005;8(2):267-278. doi:10.1016/j.devcel.2005.01.001.
231. Huang B, Ward C, Masyuk A, Masyuk T, Harris P, LaRusso N. Exosome-like Vesicles are Present in the Lumen of Rat Bile Ducts and Interact with Cholangiocyte Primary Cilia. *Microscopy and Microanalysis*. 2007;13(Supplement S02):258-259. doi:10.1017/S143192760707242X.
232. Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(4):G990-999. doi:10.1152/ajpgi.00093.2010.
233. Jackson PK. Cilia develop long-lasting contacts, with other cilia. *Cilia*. 2012;1(1):5. doi:10.1186/2046-2530-1-5.
234. ISH Data :: Allen Brain Atlas: Mouse Brain. Available at: <http://mouse.brain-map.org/>. Accessed January 3, 2013.
235. Torres JZ, Miller JJ, Jackson PK. High-throughput generation of tagged stable cell lines for proteomic analysis. *Proteomics*. 2009;9(10):2888-2891. doi:10.1002/pmic.200800873.
236. Novarino G, Akizu N, Gleeson JG. Modeling Human Disease in Humans: The Ciliopathies. *Cell*. 2011;147(1):70-79. doi:10.1016/j.cell.2011.09.014.

237. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, et al. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell*. 2007;129(6):1201-1213. doi:10.1016/j.cell.2007.03.053.
238. Liebau MC, Höpker K, Müller RU, et al. Nephrocystin-4 Regulates Pyk2-induced Tyrosine Phosphorylation of Nephrocystin-1 to Control Targeting to Monocilia. *J Biol Chem*. 2011;286(16):14237-14245. doi:10.1074/jbc.M110.165464.
239. Wolf MTF, Lee J, Panther F, Otto EA, Guan K-L, Hildebrandt F. Expression and Phenotype Analysis of the Nephrocystin-1 and Nephrocystin-4 Homologs in *Caenorhabditis elegans*. *JASN*. 2005;16(3):676-687. doi:10.1681/ASN.2003121025.
240. Winkelbauer ME, Schafer JC, Haycraft CJ, Swoboda P, Yoder BK. The *C. elegans* homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *J Cell Sci*. 2005;118(23):5575-5587. doi:10.1242/jcs.02665.
241. Jauregui AR, Barr MM. Functional characterization of the *C. elegans* nephrocystins NPHP-1 and NPHP-4 and their role in cilia and male sensory behaviors. *Experimental Cell Research*. 2005;305(2):333-342. doi:10.1016/j.yexcr.2005.01.008.
242. Kong AM, Speed CJ, O'Malley CJ, et al. Cloning and characterization of a 72-kDa inositol-polyphosphate 5-phosphatase localized to the Golgi network. *J Biol Chem*. 2000;275(31):24052-24064. doi:10.1074/jbc.M000874200.
243. Humbert MC, Weihbrecht K, Searby CC, et al. ARL13B, PDE6D, and CEP164 form a functional network for INPP5E ciliary targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(48):19691-19696. doi:10.1073/pnas.1210916109.
244. Kisseleva MV, Cao L, Majerus PW. Phosphoinositide-specific Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase IV Inhibits Akt/Protein Kinase B Phosphorylation and Leads to Apoptotic Cell Death. *J Biol Chem*. 2002;277(8):6266-6272. doi:10.1074/jbc.M105969200.
245. Stauber T, Simpson JC, Pepperkok R, Vernos I. A role for kinesin-2 in COPI-dependent recycling between the ER and the Golgi complex. *Curr Biol*. 2006;16(22):2245-2251. doi:10.1016/j.cub.2006.09.060.
246. Evans RJ, Schwarz N, Nagel-Wolfrum K, Wolfrum U, Hardcastle AJ, Cheetham ME. The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Hum Mol Genet*. 2010;19(7):1358-1367. doi:10.1093/hmg/ddq012.
247. Thyberg J, Moskalewski S. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res*. 1999;246(2):263-279. doi:10.1006/excr.1998.4326.
248. Warren G, Malhotra V. The organisation of the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(4):493-498. doi:10.1016/S0955-0674(98)80064-1.
249. Fan J, Hu Z, Zeng L, et al. Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2008;26(6):523-534. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.05.006.
250. Fujita Y, Okamoto K, Sakurai A, Gonatas NK, Hirano A. Fragmentation of the Golgi apparatus of the anterior horn cells in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations and posterior column involvement. *J Neurol Sci*. 2000;174(2):137-140.

251. Fujita Y, Ohama E, Takatama M, Al-Sarraj S, Okamoto K. Fragmentation of Golgi apparatus of nigral neurons with alpha-synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2006;112(3):261-265. doi:10.1007/s00401-006-0114-4.
252. Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(11):5472-5477.
253. Baloyannis SJ, Costa V, Michmizos D. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2004;19(2):89-93.
254. Stieber A, Chen Y, Wei S, et al. The fragmented neuronal Golgi apparatus in amyotrophic lateral sclerosis includes the trans-Golgi-network: functional implications. *Acta Neuropathol.* 1998;95(3):245-253.
255. Sakurai A, Okamoto K, Fujita Y, et al. Fragmentation of the Golgi apparatus of the ballooned neurons in patients with corticobasal degeneration and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 2000;100(3):270-274.
256. Sakurai A, Okamoto K, Yaguchi M, et al. Pathology of the inferior olivary nucleus in patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol.* 2002;103(6):550-554. doi:10.1007/s00401-001-0500-x.
257. Takamine K, Okamoto K, Fujita Y, Sakurai A, Takatama M, Gonatas NK. The involvement of the neuronal Golgi apparatus and trans-Golgi network in the human olivary hypertrophy. *J Neurol Sci.* 2000;182(1):45-50.
258. Huynh DP, Yang H-T, Vakharia H, Nguyen D, Pulst SM. Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet.* 2003;12(13):1485-1496.
259. Lin P, Li F, Zhang Y-W, et al. Calnuc binds to Alzheimer's beta-amyloid precursor protein and affects its biogenesis. *J Neurochem.* 2007;100(6):1505-1514. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04336.x.
260. Karecla PI, Kreis TE. Interaction of membranes of the Golgi complex with microtubules in vitro. *Eur J Cell Biol.* 1992;57(2):139-146.
261. Stieber A, Mourelatos Z, Gonatas NK. In Alzheimer's disease the Golgi apparatus of a population of neurons without neurofibrillary tangles is fragmented and atrophic. *Am J Pathol.* 1996;148(2):415-426.
262. Wehland J, Henkart M, Klausner R, Sandoval IV. Role of microtubules in the distribution of the Golgi apparatus: effect of taxol and microinjected anti-alpha-tubulin antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(14):4286-4290.
263. Hsiao Y-C, Tong ZJ, Westfall JE, Ault JG, Page-McCaw PS, Ferland RJ. Ahi1, whose human ortholog is mutated in Joubert syndrome, is required for Rab8a localization, ciliogenesis and vesicle trafficking. *Hum Mol Genet.* 2009;18(20):3926-3941. doi:10.1093/hmg/ddp335.

264. Lee JE, Gleeson JG. Cilia in the nervous system: linking cilia function and neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurology*. 2011;24(2):98-105. doi:10.1097/WCO.0b013e3283444d05.
265. Guarguaglini G, Duncan PI, Stierhof YD, Holmström T, Duensing S, Nigg EA. The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell*. 2005;16(3):1095-1107. doi:10.1091/mbc.E04-10-0939.
266. Perdiz D, Mackeh R, Poüs C, Baillet A. The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal*. 2011;23(5):763-771. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.014.
267. Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem*. 2009;109(3):683-693. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06013.x.
268. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, et al. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science*. 2007;317(5837):516-519. doi:10.1126/science.1143780.
269. Suzuki K, Koike T. Mammalian Sir2-related protein (SIRT) 2-mediated modulation of resistance to axonal degeneration in slow Wallerian degeneration mice: a crucial role of tubulin deacetylation. *Neuroscience*. 2007;147(3):599-612. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.059.
270. Skoufias DA, Burgess TL, Wilson L. Spatial and temporal colocalization of the Golgi apparatus and microtubules rich in deetyrosinated tubulin. *J Cell Biol*. 1990;111(5 Pt 1):1929-1937.
271. Burgess TL, Skoufias DA, Wilson L. Disruption of the Golgi apparatus with brefeldin A does not destabilize the associated deetyrosinated microtubule network. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1991;20(4):289-300. doi:10.1002/cm.970200405.
272. Efimov A, Kharitonov A, Efimova N, et al. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell*. 2007;12(6):917-930. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.002.
273. Miller PM, Folkmann AW, Maia ARR, Efimova N, Efimov A, Kaverina I. Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1069-1080. doi:10.1038/ncb1920.
274. Loktev AV, Zhang Q, Beck JS, et al. A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell*. 2008;15(6):854-865. doi:10.1016/j.devcel.2008.11.001.
275. Jaulin F, Kreitzer G. KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC. *J Cell Biol*. 2010;190(3):443-460. doi:10.1083/jcb.201006044.
276. Esteban MA, Harten SK, Tran MG, Maxwell PH. Formation of Primary Cilia in the Renal Epithelium Is Regulated by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *JASN*. 2006;17(7):1801-1806. doi:10.1681/ASN.2006020181.

277. Lutz MS, Burk RD. Primary Cilium Formation Requires von Hippel-Lindau Gene Function in Renal-Derived Cells. *Cancer Res.* 2006;66(14):6903-6907. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0501.
278. Schermer B, Ghenoiu C, Bartram M, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein controls ciliogenesis by orienting microtubule growth. *J Cell Biol.* 2006;175(4):547-554. doi:10.1083/jcb.200605092.
279. Hergovich A, Lisztwan J, Barry R, Ballschmieter P, Krek W. Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nature Cell Biology.* 2002;5(1):64-70. doi:10.1038/ncb899.
280. Lolkema MP, Mehra N, Jorna AS, van Beest M, Giles RH, Voest EE. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein influences microtubule dynamics at the cell periphery. *Experimental Cell Research.* 2004;301(2):139-146. doi:10.1016/j.yexcr.2004.07.016.
281. Berbari NF, Sharma N, Malarkey EB, et al. Microtubule modifications and stability are altered by cilia perturbation and in cystic kidney disease. *Cytoskeleton.* 2012:n/a-n/a. doi:10.1002/cm.21088.
282. Pieczynski J, Margolis B. Protein complexes that control renal epithelial polarity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300(3):F589-F601. doi:10.1152/ajprenal.00615.2010.
283. Goldstein B, Macara IG. The PAR Proteins: Fundamental Players in Animal Cell Polarization. *Developmental Cell.* 2007;13(5):609-622. doi:10.1016/j.devcel.2007.10.007.
284. Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci.* 2006;119(6):979-987. doi:10.1242/jcs.02898.
285. Lynch AM, Hardin J. The assembly and maintenance of epithelial junctions in *C. elegans*. *Front Biosci.* 2009;14:1414-1432.
286. Etemad-Moghadam B, Guo S, Kempthues KJ. Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell.* 1995;83(5):743-752. doi:10.1016/0092-8674(95)90187-6.
287. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat Cell Biol.* 2010;12(11):1115-1122. doi:10.1038/ncb2117.
288. Sfakianos J, Togawa A, Maday S, et al. Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 2007;179(6):1133-1140. doi:10.1083/jcb.200709111.
289. Fan S, Hurd TW, Liu C-J, et al. Polarity Proteins Control Ciliogenesis via Kinesin Motor Interactions. *Current Biology.* 2004;14(16):1451-1461. doi:10.1016/j.cub.2004.08.025.
290. Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature.* 2003;421(6924):753-756. doi:10.1038/nature01423.
291. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2009;10(8):538-549. doi:10.1038/nrm2729.

292. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*. 1996;84(3):359-369. doi:10.1016/S0092-8674(00)81280-5.
293. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*. 2003;302(5651):1704-1709. doi:10.1126/science.1092053.
294. Wang S, Watanabe T, Matsuzawa K, et al. Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *J Cell Biol*. 2012;199(2):331-345. doi:10.1083/jcb.201202041.
295. Pegtel DM, Ellenbroek SIJ, Mertens AEE, van der Kammen RA, de Rooij J, Collard JG. The Par-Tiam1 Complex Controls Persistent Migration by Stabilizing Microtubule-Dependent Front-Rear Polarity. *Current Biology*. 2007;17(19):1623-1634. doi:10.1016/j.cub.2007.08.035.
296. Moon HM, Wynshaw-Boris A. Cytoskeleton in action: lissencephaly, a neuronal migration disorder. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2013;2(2):229–245. doi:10.1002/wdev.67.
297. Molina A, Velot L, Ghouinem L, et al. ATIP3, a Novel Prognostic Marker of Breast Cancer Patient Survival, Limits Cancer Cell Migration and Slows Metastatic Progression by Regulating Microtubule Dynamics. *Cancer Res*. 2013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3565.
298. Ganguly A, Yang H, Sharma R, Patel KD, Cabral F. The Role of Microtubules and Their Dynamics in Cell Migration. *J Biol Chem*. 2012;287(52):43359-43369. doi:10.1074/jbc.M112.423905.
299. Howard A, Pelc S. Synthesis of Desoxyribonuclein Acid in Normal and Irradiated Cells and its Relation to Chromosome Breakage. *Heredity*. 1953;6:261-273.
300. Quarmby LM, Parker JDK. Cilia and the cell cycle? *J Cell Biol*. 2005;169(5):707-710. doi:10.1083/jcb.200503053.
301. Schermer B, Benzing T. Cilia meet cancer - neue Einblicke in die Pathogenese des Nierenzellkarzinoms. *NephroNews*. (5/07).
302. Boleti H, Karsenti E, Vernos I. Xklp2, a Novel Xenopus Centrosomal Kinesin-like Protein Required for Centrosome Separation during Mitosis. *Cell*. 1996;84(1):49-59. doi:10.1016/S0092-8674(00)80992-7.
303. Cole NB, Sciaky N, Marotta A, Song J, Lippincott-Schwartz J. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell*. 1996;7(4):631-650.

8 Publikationen

8.1 Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

M. Ellerbeck, A. Schüßler, D. Brucker, C. Dafinger, F. Loos, A. Brachmann (2013) Characterization of three ammonium transporters of the glomeromycotan fungus *Geosiphon pyriformis*. *Eukaryotic Cell* 12(11), 1554-62

M. P. Bartram, M. Höhne, C. Dafinger, L. A. Völker, M. Albersmeyer, J. Heiss, H. Göbel, H. Brönneke, V. Burst, M. C. Liebau, T. Benzing, B. Schermer, R. U. Müller (2013) Conditional loss of kidney microRNAs results in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *J Mol Med*, Epub ahead of print 2013 Jan 24

T. Eisenberger, R. Slim, A. Mansour, M. Nauck, G. Nürnberg, P. Nürnberg, C. Decker, C. Dafinger, I. Ebermann, C. Bergmann, H. J. Bolz (2012) Targeted next-generation sequencing identifies a homozygous nonsense mutation in *ABHD12*, the gene underlying PHARC, in a family clinically diagnosed with Usher syndrome type 3. *Orphanet J Rare Dis* 7(1), 59

L. Borgal, S. Habbig, J. Hatzold, M. C. Liebau, C. Dafinger, I. Sacarea, M. Hammerschmidt, T. Benzing, B. Schermer (2012) The Ciliary Protein Nephrocystin-4 Translocates the Canonical Wnt-Regulator Jade-1 to the Nucleus to Negatively Regulate Beta-Catenin Signaling. *JBC* 287(30), 25370-80

C. Dafinger, M. C. Liebau, S. M. Elsayed, Y. Hellenbroich, E. Boltshauser, G. C. Korenke, F. Fabretti, A. R. Janecke, I. Ebermann, G. Nürnberg, P. Nürnberg, H. Zentgraf, K. Addicks, E. Elsobky, T. Benzing, B. Schermer, H. J. Bolz (2011) Mutations in *KIF7* link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubular dynamics. *J Clin Invest* 121(7), 2662-7

M. C. Liebau, K. Höpker, R. U. Müller, I. Schmedding, S. Zank, B. Schairer, F. Fabretti, M. Höhne, M. P. Bartram, C. Dafinger, M. Hackl, V. Burst, S. Habbig, H. Zentgraf, A. Blaukat, G. Walz, T. Benzing, B. Schermer (2011) Nephrocystin-4 regulates Pyk2-induced tyrosine phosphorylation of Nephrocystin-1 to control targeting to monocilia. *J Biol Chem* 286 (16), 14237-45

S. M. Baig, A. Koschak, A. Lieb, M. Gebhart, C. Dafinger, G. Nürnberg, A. Ali, I. Ahmad, M. J. Sinnegger-Brauns, N. Brandt, J. Engel, M. E. Mangoni, M. Farooq, H. U. Khan, P. Nürnberg, J. Striessnig, H. J. Bolz (2011) Loss of *Cav1.3* (*CACNA1D*) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14 (1), 77-84

I. Ebermann, J. B. Phillips, M. C. Liebau, R. K. Koenekoop, B. Schermer, I. Lopez, E. Schäfer, A. F. Roux, C. Dafinger, A. Bernd, E. Zrenner, M. Claustres, B. Blanco, G. Nürnberg, P. Nürnberg, R. Ruland, M. Westerfield, T. Benzing, H. J. Bolz (2010) *PDZD7* is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *J Clin Invest* 120 (6), 1812-23

8.2 Publikationen in internationalen akademischen Kongressen

C. Dafinger, M. C. Liebau, I. Schmedding, S. Habbig, B. Schairer, O. Rinner, R. Aebersold, J. C. Brüning, T. Wunderlich, T. Benzing, B. Schermer (2014) Role of RUVBL1 in disease-associated protein complexes and renal tubular architecture *in vivo* (Posterpräsentation). Crossroads in Biology 2014, 5. Internationales Symposium, Köln, Deutschland

C. Dafinger, M. C. Liebau, S. M. Elsayed, Y. Hellenbroich, E. Boltshauser, G. C. Korenke, F. Fabretti, A. R. Janecke, I. Ebermann, G. Nürnberg, P. Nürnberg, H. Zentgraf, F. Koerber, K. Addicks, E. Elsobky, T. Benzing, H. J. Bolz, B. Schermer (2012) Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubular dynamics (Posterpräsentation). Crossroads in Biology 2012, 4. Internationales Symposium, Köln, Deutschland

C. Dafinger, M. C. Liebau, S. M. Elsayed, Y. Hellenbroich, E. Boltshauser, G. C. Korenke, F. Fabretti, T. Benzing, H. J. Bolz, B. Schermer (2011) Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubular dynamics (Vortrag). EMBO Konferenzserie "Centrosomes and Spindle Pole Bodies", Barcelona, Spanien

C. Dafinger, M. C. Liebau, S. M. Elsayed, Y. Hellenbroich, E. Boltshauser, G. C. Korenke, F. Fabretti, A. R. Janecke, I. Ebermann, G. Nürnberg, P. Nürnberg, H. Zentgraf, F. Koerber, K. Addicks, E. Elsobky, T. Benzing, H. J. Bolz, B. Schermer (2011) Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubular dynamics (Posterpräsentation und Vortrag). 3. EMBO Meeting, Wien, Österreich

9 Danksagungen

Ich danke PD Dr. Hanno Bolz für seine Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit in der Humangenetik.

Ich danke meinen Betreuern Prof. Dr. Thomas Benzing, Prof. Dr. Peter Kloppenburg und PD Dr. Bernhard Schermer für die gute Betreuung und Unterstützung und viele beratende Gespräche. Außerdem danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Benzing für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit unter seiner leitenden Hand durchführen zu können.

Ich danke unseren Kooperationspartnern für die Bereitstellung von Patientenmaterial und ihre freundliche Hilfe bei der Durchführung funktioneller Analysen. Zudem danke ich den betroffenen Familien für die Erlaubnis zur Analyse und Veröffentlichung ihrer Daten.

Ich danke meinen Arbeitskollegen für eine tolle Arbeitsatmosphäre, ihre Aufmunterungen in unproduktiven Zeiten, ihre Hilfestellung bei Problemen (sowohl bei der Arbeit als auch im Privatleben) und viele hilfreiche Diskussionen, die mich meist wieder auf den richtigen Weg führten. Ein besonderer Dank dabei geht an Dr. Max Liebau, Dr. Lori Borgal und Sybille Köhler.

Ich danke meinen Freunden für die geistige und auch körperliche Ablenkung von der Laborarbeit und für ihre scheinbar unendliche Geduld. Euch habe ich es zu verdanken, dass die Forschung nicht meine einzige (Freizeit-)beschäftigung war.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung und das Vertrauen während der gesamten Zeit. Ich weiß das sehr zu schätzen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dafinger
Vorname	Claudia
Geburtstag	26.05.1983
Geburtsort	Dachau
Nationalität	deutsch

Promotion

Seit Januar 2010	Klinikum der Universität zu Köln, Innere Medizin II, Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Benzing unter der Anleitung von Prof. Dr. T. Benzing Titel: Molekulare Pathogenese des Joubert-Syndroms - Die Rolle des Proteins KIF7
Oktober 2008 – Dezember 2009	Klinikum der Universität zu Köln, Institut für Humangenetik, Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Bolz unter der Anleitung von PD Dr. H. Bolz Titel: Genetic basis and molecular mechanisms of inherited hearing and visual impairment and related disorders

Akademische Ausbildung

Juni 2007 – April 2008	Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Genetik, Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Parniske unter Anleitung von PD Dr. A. Schübler Titel: "Isolation of <i>Geosiphon pyriformis</i> transporter genes by functional complementation of yeast mutant strains"
Oktober 2003 – April 2008	Ludwig-Maximilians-Universität München, Studium der Biologie Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Mikrobiologie, Neurobiologie Akademischer Abschluss: Diplom

Schulische Ausbildung

September 1993 – Juni 2002	Gymnasium Bad Aibling, Bayern
September 1989 – Juni 1993	Grundschule Feldkirchen-Westerham, Bayern

Köln, den

11 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. med. Thomas Benzing, Prof. Dr. rer. nat. Peter Kloppenburg und Priv-Doz. Dr. med. Bernhard Schermer betreut worden.

Teilpublikationen sind in Kapitel 8 angegeben.

Claudia Dafinger, Köln den