Aus dem Institut für Physiologie
(Direktor Prof. Dr. med. Rainer Rettig)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Einfluss der (Pro)Reninrezeptor ((P)RR, ATP6ap2) *Downregulation* auf primäre Zilien und den Zellzyklus in As4.1 Zellen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald

2020

vorgelegt von:
Lukas Hermann Vogel
geb. am: 30.01.1990
in: Wesel

Dekan
Prof. Dr. Karlhans Endlich

Gutachter
Prof. Dr. Jörg Peters, Greifswald
Prof. Dr. Sigrid Hoffmann, Mannheim

Disputation
10.03.2021, Hörsaal Anatomie, Greifswald

1. EINLEITUNG 3

1.1. Struktur, Lokalisation und Bindungspartner des (Pro)Renin-Rezeptors 3

1.2. Signalkaskaden des (P)RR 5

1.3. Transkriptomanalyse in As4.1 Zellen 12

1.4. Das primäre Zilium 14

1.5. Der Zellzyklus 15

1.6. Zielstellung der Arbeit 17

2. MATERIAL UND METHODEN 18

2.1. Material 18

2.2. Methoden 24

3. ERGEBNISSE 39

3.1. Validierung der Transkriptveränderung nach *Downregulation des (P)RRs* 39

3.2. Effekte der (P)RR *Downregulation* auf Wnt-Zielgene 48

3.3. Rolle der Zellkulturbedingungen für die Expression des (P)RRs 51

4. DISKUSSION 60

4.1. Assoziation zwischen (P)RR-*Downregulation* und primärem Zilium 60

4.2. Beeinflusst der Zellzyklus die (P)RR-Expression? 62

4.3. Einfluss der (P)RR-*Downregulation* auf die Wnt-Pathways 65

ZUSAMMENFASSUNG 68

1. Einleitung

1.1. Struktur, Lokalisation und Bindungspartner des (Pro)Renin-Rezeptors

Erstbeschreiber des (Pro)Renin-Rezeptors [(P)RR] als Komponente der Zellmembran waren 2002 Nguyen et al. (Nguyen, Delarue et al. 2002). Der Rezeptor besteht aus 350 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 37 kDa und lässt sich in ein Signalpeptid, eine extra- und intrazelluläre Domäne, sowie eine einzelne Transmembrandomäne gliedern. Das codierende Gen für den (P)RR liegt auf Chromosom X Lokus p11.4 und trägt den Namen (P)RR bzw. ATP6 *associated adaptor protein 2* (ATP6ap2) (Nguyen and Danser 2008).

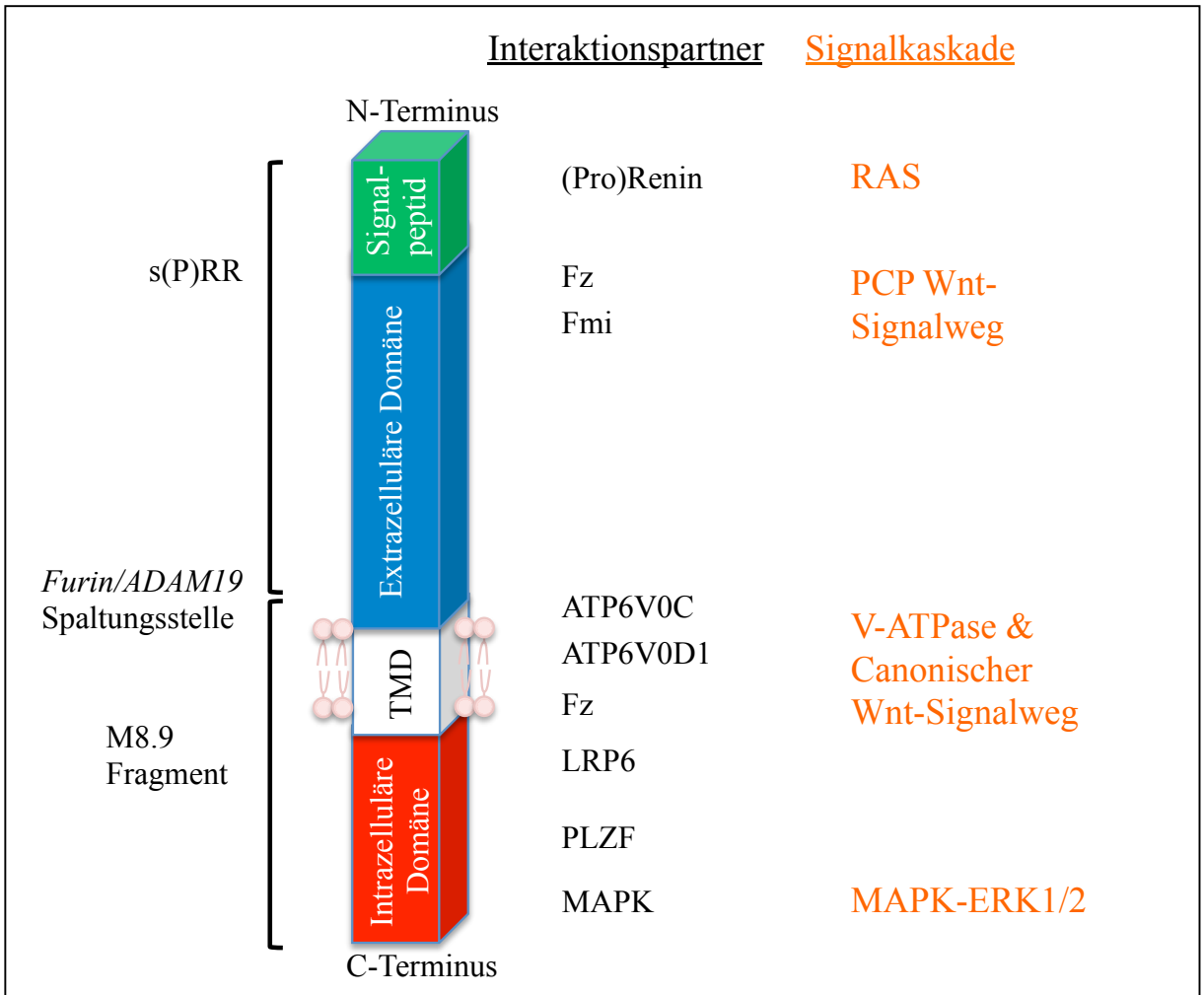


Abbildung 1.1 (Pro)Renin Rezeptor: Aufbau, Interaktionspartner, Signalkaskaden

Der (P)RR besteht aus einer N-terminalen extrazellulären, einer C-terminalen intrazellulären und einer transmembranären Domäne (TMD). Er kann in den löslichen (P)RR [s(P)RR] und das C-terminale M8.9 Fragment gespalten werden. Die verschiedenen Segmente werden unterschiedlichen Signalwegen zugeordnet (modifiziert nach Rousselle, Sihn et al. 2014).

Der (P)RR kann im Golgi-Apparat durch *Furin* oder *ADAM19* in zwei Fragmente gespalten werden (Cousin, Bracquart et al. 2009, Nguyen 2011). Es resultieren zum einen das C-terminale M8.9 Fragment und zum anderen der N-terminale, lösliche (P)RR [*soluble* (P)RR bzw. s(P)RR]. Das kleine M8.9 Fragment wurde bereits 1998, unabhängig vom (P)RR, als 8,9 kDa schwere accessorische Untereinheit von vakuolären Protonen-Pumpen (V-ATPasen) in chromaffinen Zellen der Nebenniere beschrieben (Ludwig, Kerscher et al. 1998). Dies führte zur Namensgebungen ATP6ap2 bzw. *vacuolar H^+ ATPase M8.9 accessory subunit* (VhaM8.9). Das C-terminale M8.9 Fragment des (P)RR wird nicht nur in Vertebraten, sondern auch in Invertebraten, wie der Taufliege *Drosophila Melanogaster*, dem Krallenfrosch *Xenopus* (Cruciat, Ohkawara et al. 2010) oder in Zebrafischen *Danio rerio* (Amsterdam, Nissen et al. 2004) exprimiert, die kein Renin-Angiotensin-System (RAS) besitzen. Der N-terminale Teil des Rezeptors mit der Bindungsstelle für Prorenin und Renin [(Pro)Renin] wird dagegen nur in Vertebraten exprimiert (Burckle and Bader 2006). Nguyen et al. postulierten, dass die N- und C-terminalen Domänen einen unterschiedlichen evolutionären Hintergrund und verschiedene Funktionen haben (Nguyen, Delarue et al. 2002). Demnach agiert der intrazelluläre C-terminale Anteil unabhängig von *(Pro)Renin*, während die evolutionär jüngere, N-terminale Domäne mit der *(Pro)Renin*-Bindungsstelle RAS-abhängige Funktionen vermittelt.

Der (P)RR ist ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert. Besonders hohe (P)RR-Level sind im Gehirn, der Plazenta, im Herzen, im Pankreas und in hämatopoetischen Zellen nachweisbar, während die Leber und die Niere eine niedrige Expression aufweisen (Nguyen, Delarue et al. 2002). Auf zellulärer Ebene muss zwischen den einzelnen Fragmenten und dem Volllängen-(P)RR unterschieden werden. Tatsächlich ist der (P)RR nur zu einem geringen Anteil in der Zellmembran verankert (Ludwig, Kerscher et al. 1998, Nguyen, Delarue et al. 2002). Hauptsächlich kommt der Rezeptor intrazellulär in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (Schefe, Menk et al. 2006), des Golgi-Apparats, Vesikeln, Lysosomen, Endosomen und Mikrosomen (Saris, t Hoen et al. 2006) vor. Er ist aber auch im Zytosol und in Mitochondrien nachweisbar (Kanda, Noda et al. 2015, Wanka, Lutze et al. 2017). Das kurze C-terminale M8.9 Fragment wurde in Assoziation mit V-ATPasen in Membranen des Golgi-Apparats (Cousin, Bracquart et al. 2009), von Vesikeln (Kinouchi, Ichihara et al. 2010), Lysosomen (Schefe, Menk et al. 2006), Autophagosomen (Korvatska, Strand et al. 2013) und Endosomen (Cruciat, Ohkawara et al. 2010) belegt. Der s(P)RR wird nach Spaltung des Rezeptors im Blutplasma und im Urin gefunden, wo er mit (Pro)Renin interagieren kann (Cousin, Bracquart et al. 2009, Nguyen and Muller 2009).

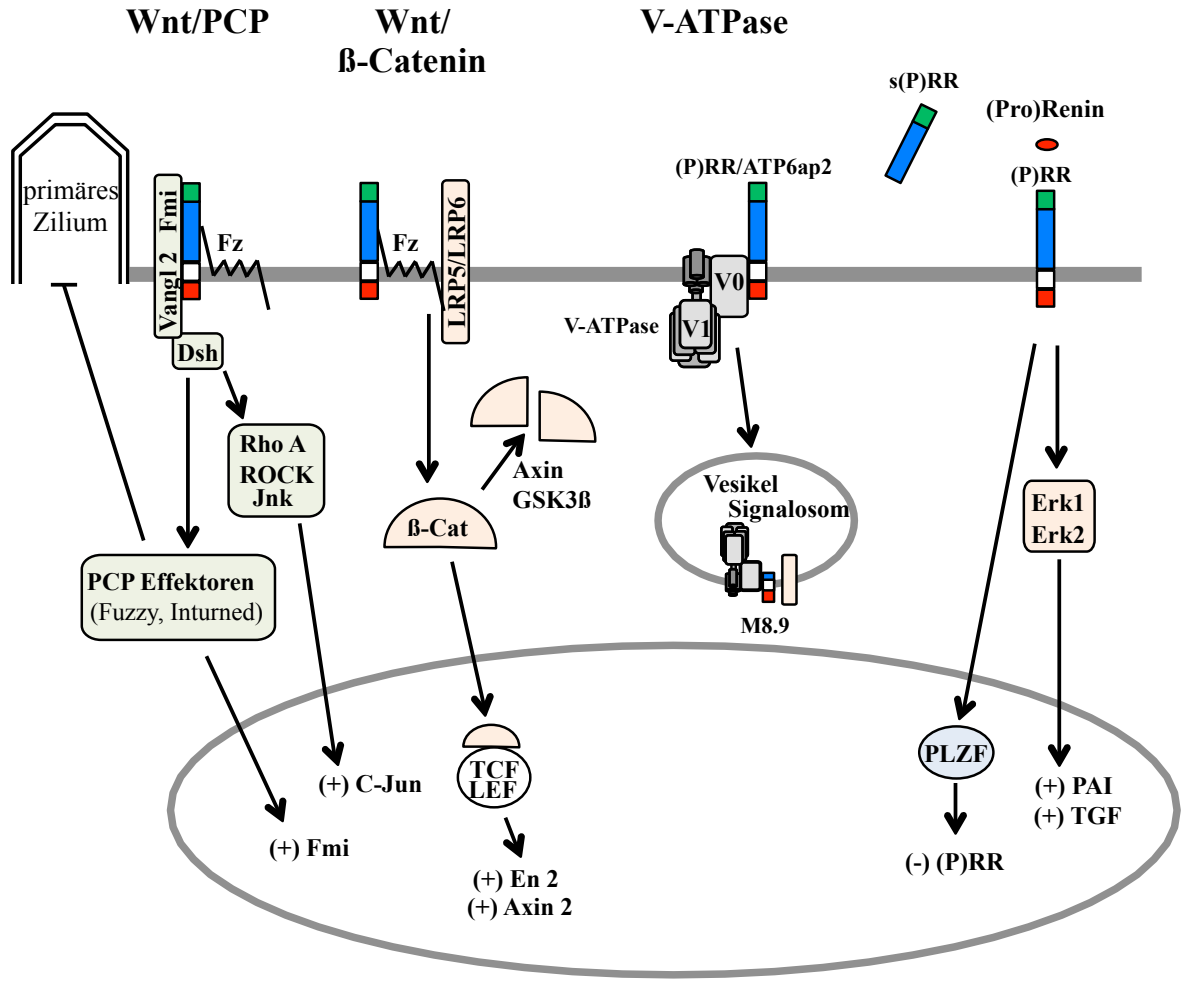


Abbildung 1.2: Signalwege mit (P)RR-Beteiligung (von links nach rechts)

Wnt/PCP: Der (P)RR hat durch Interaktion mit dem Korezeptor *Flamingo* (Fmi), dem Kernprotein *Van Gogh like protein 2* (Vangl 2) über die kleinen G-Proteine und über die PCP-Effektoren *Fuzzy* und *Inturned* Änderungen der Genexpression, des Zytoskeletts und des Ziliums zur Folge. **Wnt/ß-Catenin:** Führt mit den Korezeptoren LRP5/6 zur Aktivierung von TCF/LEF und den Effektoren *Engrailed 2* (En 2) und *Axin 2*. **Vesikel:** M8-9 Fragment oder Volllängen-ATP6ap2 ist für die Ansäuerung und damit für Transport und Funktion von Vesikeln, Endosomen, Lysosomen und dem Wnt-Signalosom notwendig. **PLZF:** Bewirkt nach Aktivierung und Translokation eine Feedback-Hemmung der (P)RR-Expression. **ERK1/2:** Führt zur Expression des *Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1* (PAI-1) und *Transforming Growth Factor ß* (TGFβ) Expression (modifiziert nach Sihn, Rousselle et al. 2010, Nguyen 2011).

Signalkaskaden des (P)RR

Wegen der vielfältigen Lokalisationen und den zahlreichen Interaktionspartnern wird ersichtlich, dass der (P)RR als Volllängen-Rezeptor oder M8.9 Fragment ein multifunktionales Protein ist (Abb. **1.2**): (1) Er fungiert als Rezeptor für (Pro)Renin und ist so an der Aktivierung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) in den Geweben beteiligt. (2) Er bewirkt nach Bindung von (Pro)Renin die Aktivierung von Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), wie den *Extracellular Signal-Related Protein Kinases 1* und *2* (ERK1/2) und die Translokation des *Promyelocytic Leukaemia Zink Finger Protein 1* (PLZF) in den Kern. (3) Er, ATP6ap2, interagiert mit V-ATPasen und beeinflusst deren Aktivität. (4) Des Weiteren ist er Teil der Wnt-Rezeptor Signalkaskade, die für die embryonale Entwicklung und das zelluläre Wachstum essentiell sind (zusammengefasst in Sihn, Rousselle et al. 2010, Peters 2017).

RAS-abhängige Effekte des (P)RR

Für die Vermittlung der RAS-abhängigen Signale ist die extrazelluläre (Pro)Renin-Bindung am Volllängen-(P)RR bzw. am s(P)RR essentiell (Methot, Silversides et al. 1999, Nguyen, Delarue et al. 2002, Cousin, Bracquart et al. 2009). Dabei wird das Prosegment des Prorenins reversibel mit Freigabe des aktiven Zentrums aufgeklappt. Durch diese Konformationsänderung erreicht das Prorenin die Aktivität des aktiven Renins. Bindet das bereits *in vivo* durch die Enzyme Prokonvertase-1 oder Cathepsin B aktivierte Renin an den (P)RR, ist dessen katalytische Aktivität im Vergleich zum aktiven, ungebundenen Renin 4-5fach erhöht (Nguyen, Delarue et al. 2002). Es resultiert eine erhöhte Bildung von Angiotensin (ANG) I und im Zusammenspiel mit dem *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) eine lokale Bildung von ANG II. Durch die ANG II-abhängige Aktivierung des AT1 Rezeptors werden dann zahlreiche neuronale, kardiovaskuläre und renale Funktionen reguliert, wobei es zur Entwicklung von Endorganschäden, insbesondere essentieller Hypertonie und bei Diabetes Mellitus kommen kann (Rademaker, Yandle et al. 2012, Danser 2015). In diesem Zusammenhang wurde durch Blockade des (P)RR mit einem synthetischen *Handle Region Peptid* (HRP) in spontan hypertensiven Ratten sowohl eine linksventrikuläre Fibrose, als auch eine Beeinträchtigung der renalen Funktion reduziert (Susic, Zhou et al. 2008). Auch bei diabetischen Ratten konnte die nach Prorenin-(P)RR-Interaktion induzierte Proteinurie, Nephropathie und Glomerulosclerose durch (P)RR-Blockade gehemmt werden (Ichihara, Suzuki et al. 2006, Takahashi, Ichihara et al. 2007). Allerdings können die (Pro)Renin-(P)RR-induzierten Endorganschäden über unterschiedliche Pathways vermittelt werden: (1) ANG-abhängig durch Aktivierung der RAS-

Kaskade und (2) unabhängig von einer ANG-Bildung über die Stimulation des MAPK-ERK1/2-Pathways.

(Pro)Renin-abhängige, RAS-unabhängige Funktionen des (P)RR

Nguyen et al. (Nguyen, Delarue et al. 2002) dokumentierten in renalen Mesangialzellen, dass eine Renin-(P)RR-Interaktion zu einer raschen intrazellulären Aktivierung des MAPK-ERK1/2-Signalweges führt. Dabei bestätigte der Einsatz von β-Blockern und AT_1-Rezeptor-Antagonisten, dass die ERK1/2-Phosphorylierung Renin-vermittelt, aber unabhängig von einer ANG II-Bildung erfolgt. Die Aktivierung dieses Signalweges ist nachfolgend mit der Synthese und Sekretion von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Komponenten, wie dem *Transforming Growth Factor β1* (TGF-β1), *Cyclooxygenase 2* (COX2) oder *Plasminogen Activator Inhibitor Type 1* (PAI-1) in verschiedenen Zelltypen assoziiert (Nguyen, Delarue et al. 2002, Huang, Wongamorntham et al. 2006, Zhang, Noble et al. 2008, Roskoski 2012).

Auf diese Weise kann die (Pro)Renin-(P)RR Interaktion zu einer direkten Zell- und Gewebeschädigung beitragen und an der Pathogenese von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen beteiligt sein. So kommt es bei Ratten über die Signaltransduktionskette (Pro)Renin-(P)RR-MAP-Kinase ERK1/2 zur Entwicklung einer diabetischen Nephropathie (Nguyen, Delarue et al. 2002, Ichihara, Hayashi et al. 2004).

Die (Pro)Renin-(P)RR-Interaktion bewirkt darüber hinaus die Aktivierung einer negativen Feedback-Schleife durch Wechselwirkung der kurzen zytoplasmatischen (P)RR-Domäne mit dem Transkriptionsfaktor PLZF, nachfolgend dessen Translokation in den Kern und Suppression der (P)RR Expression (Schefe, Menk et al. 2006, Kirsch, Schrezenmeier et al. 2014). Andere Studien belegen, dass der PLZF als Repressor zahlreiche Entwicklungsprozesse u.a. den Zellzyklus beeinflusst (Suliman, Xu et al. 2012). Bei Tumorzellen führt die Bindung des PLZF an den Cyclin-A2 Promotor zur Hemmung der Cyclin-A2 Expression und zum Zellzyklusarrest in der S-Phase (Yeyati, Shaknovich et al. 1999).

(Pro)Renin-unabhängige Funktionen des (P)RR

Untersuchungen an (P)RR-defizienten Zebrafischen, die kein RAS-System besitzen, verdeutlichen die Bedeutung des (P)RR für essentielle, aber RAS-unabhängige intrazelluläre Prozesse, die in Kooperation mit der *Vacuolar-Type* H^+-ATPase (V-ATPase) erfolgen.

Die V-ATPase ist ein Multiprotein-Komplex (14 Untereinheiten), der aus einer für die Protonen-Translokation notwendigen V0 Domäne und der ATP-hydrolysierenden V1 Domäne besteht (Beyenbach and Wieczorek 2006). Daneben gibt es die accessorischen Untereinheiten

Ac45 (ATP6ap1) und den (P)RR/ATP6ap2, welche die Funktion der V-ATPase mitbestimmen. Funktionell sind V-ATPasen u.a. für die Aufrechterhaltung der Azidifikation von Endosomen und Lysosomen, für die intrazelluläre pH-Homeostase, sowie für den Protein-Transport, -Reifung und –Recycling, als auch für den Protein-Abbau durch pH-abhängige Enzyme in den sauren Vesikeln relevant (Marshansky and Futai 2008, Tani, Yamada et al. 2015). Nach einer Arbeit von Kinouchi et al. belegt eine gewebsspezifische Deletion des (P)RR in Mäusen, unter Einsatz des Cre/Lox Systems, einen Zusammenhang von V-ATPasen und (P)RR im Rahmen der Autophagie, sowie dem physiologischen Abbau von Organellen und Proteinen. Die Mäuse weisen nach (P)RR-Ablation im Herzen sowohl degenerierte Kardiomyozyten, als auch eine erhöhte Akkumulation von Autophagosomen auf und versterben innerhalb von 3 Wochen (Kinouchi, Ichihara et al. 2010). Ähnliche Resultate mit Störung der Autophagie, erhöhtem ER-Stress und Tod nach 2-4 Wochen, traten in Mäusen auf, bei denen der (P)RR spezifisch in Podozyten depletiert wurde (Oshima, Kinouchi et al. 2011, Riediger, Quack et al. 2011). Außerdem wiesen die Podozyten ein verändertes Zytoskelett, Verlust von Differenzierungsmarkern und eine erhöhte Nekroserate auf. Nicht nur die (P)RR-Ablation, sondern auch die direkte Hemmung der V-ATPase durch Bafilomycin ruft einen ähnlichen Phänotyp hervor, sodass eine funktionelle Verbindung naheliegt (Advani, Kelly et al. 2009). Eine wechselseitige Beeinflussung von (P)RR und V-ATPase wurde zudem durch den Anstieg der ATP6ap2 Transkriptmenge unter Bafilomycin-induzierter Inhibierung der V-ATPasen (Kinouchi, Ichihara et al. 2010) bzw. durch *Downregulation* verschiedener Untereinheiten der V-ATPase V0-Domäne nach (P)RR-Depletion deutlich (Kinouchi, Ichihara et al. 2010, Riediger, Quack et al. 2011).

Daneben ist die Interaktion zwischen V-ATPase und (P)RR für die Vermittlung des Notch- (Yan, Denef et al. 2009) und der Wnt-Signalwege (Cruciat, Ohkawara et al. 2010, Sihn, Rousselle et al. 2010) unabdingbar, welche zu den RAS-unabhängigen (P)RR-Signalwegen zählen.

Die Wnt-Signalwege

Die Entwicklung und Homeostase von multizellulären Organismen wird sowohl im embryonalen, als auch im adulten Stadium durch das Wechselspiel zwischen Zellproliferation und Differenzierung, Zellmigration und Adhäsion, sowie Zelltod bestimmt und über eine koordinierte Genexpression und Interaktion mit benachbarten Zellen erreicht. Bei der Initiierung und Koordination dieser zellulären Antworten spielen die Wnt-Pathways eine zentrale Rolle (Steinhart and Angers 2018). Die Namensgebung „Wnt“ setzt sich aus Wg für *wingless*, ei-

nem flügellosen Phänotyp der Taufliege *Drosophila*, und dem Proto-Onkogen *Int1* zusammen (Wang, Huang et al. 2014). Die Wnt-Signalwege lassen sich in einen kanonischen, sowie die beiden nicht-kanonischen *Planar Cell Polarity* (PCP) bzw. die Ca^{2+}-abhängige Signalkaskaden unterteilen.

Kanonischer, ß-Catenin vermittelter Wnt

Die Arbeitsgruppe um Cruciat (Cruciat, Ohkawara et al. 2010) postulierte, dass bei der Initiierung der Wnt/*ß-Catenin* Signalkaskade die extrazelluläre (P)RR-Domäne als Bindeglied zwischen dem Wnt-Komplex, bestehend aus Wnt-Ligand und den Wnt-Rezeptoren LRP6, Frizzled 8 (Fz8) und der V-ATPase fungiert und somit die Bildung eines Signalosoms ermöglicht (Bilic, Huang et al. 2007). Nachfolgend wird LRP6 durch die *Glykogen Synthase Kinase 3* (GSK3) und die C*asein Kinase 1* (CK1) phosphoryliert (Zeng 2005). Hierfür ist das durch die V-ATPase generierte saure Milieu im Signalosom notwendig (Cruciat, Ohkawara et al. 2010). Durch Bindung von Axin an LRP5/6 wird der β-Catenin-Abbaukomplex inaktiviert und β-Catenin stabilisiert. Das akkumulierte β-Catenin transloziert in den Zellkern, bildet einen Komplex mit dem *T Cell Factor* (TCF), sowie dem *Lympoid Enhancer Factor* (LEF) und ermöglicht die Expression der Wnt-Zielgene u.a. *Engrailed 2* (En2) und Axin 2 (L. Lynn Mc Grew 1999, Jho, Zhang et al. 2002, MacDonald, Tamai et al. 2009).

Ohne die aufgeführte Aktivierung des kanonischen Wnt, wird der ß-Catenin-Abbaukomplex nicht deaktiviert, ß-Catenin wird destabilisiert und die Zieltranskripte vermindert transkribiert.

Der kanonische Wnt/ß-Catenin-Signalweg ist für das Wachstum von Zellen maßgebend und an der Kanzerogenese beteiligt (Clevers and Nusse 2012). Im Rahmen der Embryogenese ist dieser Signalweg an der Ausbildung der anteroposterioren Achse beteiligt (Niehrs 2010), spielt in adulten Organismen bei der Wiederherstellung oder Selbsterneuerung von Geweben eine wichtige Rolle (Steinhart and Angers 2018) und beeinflusst durch die Regulierung der GSK3 und nachgeschaltete Cycline, den Zellzyklusprogress und die Proliferation (Niehrs and Acebron 2012).

Planar-cell-polarity (PCP) - Wnt

Ursprünglich wurde der Wnt/PCP-Pathway in *Drosophila* identifiziert, wo er die Organisation und Orientierung kutikaler Strukturen wie den Haaren der Flügel oder den Körperborsten in proximal-distaler Ausrichtung bestimmt (Gubb and Garcia-Bellido 1982). Während der Morphogenese und Gastrulation ist er u.a. an der Zellmigration und der Schließung des Neuralrohrs beteiligt (Veemann, Axelrod et al. 2003, Simons and Mlodzik 2008, Tada and Kai 2009). Funktionell wird der PCP-Signalweg über Mitglieder der *Frizzled* (Fz) Rezeptor-Familie und eine Phosphorylierung von *Vangl 2* initiiert (Yang and Mlodzik 2015, Yang, Garrett et al. 2017). Vermittelt über *Disevelled* (Dsh) und *Dsh Associated Activator of Morphogenesis 1* (Daam1) kommt es via *Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate* (Rac) oder *Rho Associated Protein Kinase* (ROCK) zur Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) und letztlich zur cJUN (J*un Oncogene*)-regulierten Transkription (Leung, Chen et al. 1996, Rosso, Sussman et al. 2005). In *Drosophila* werden *Fuzzy* (Fuz) und *Inturned* (Intu) als Effektoren des Wnt-PCP propagiert (Lee and Adler 2002), wobei Heydeck et al. ihre Rolle im ziliären Aufbau sehen (Heydeck and Liu 2011).

Um schließlich zum (P)RR zurückzukommen; eine Notwendigkeit des (P)RR im Wnt/PCP-Signalweg leiteten Hermle et al. (Hermle, Saltukoglu et al. 2010) aus Haar- und Borstendefekten nach (P)RR/VhaPRR-*Knockdown* in *Drosophila* ab. Hier fungiert der (P)RR als Stabilisator eines Rezeptorkomplexes, welcher aus 6 Proteinen (u.a. Fmi/Celsr und Fz) besteht. Zusätzlich ist der (P)RR, in Kooperation mit der V-ATPase, am vesikulären Transport des Wnt-Rezeptors Fz zur distalen Plasmamembran von Epithelien beteiligt (Hermle, Saltukoglu et al. 2010). Bei Fehlen des (P)RR wird Fz verzögert transportiert und es resultieren die bereits beschriebenen Haar- und Borstendefekte in den *Drosophila*-Flügeln. Da sich ein ähnlicher Phänotyp auch unter Knockdown anderer V-ATPasen induzieren ließ, scheint die eingeschränkte Transportkapazität mit der Fehlfunktion der V-ATPase asoziierten Untereinheit einherzugehen (Cruciat, Ohkawara et al. 2010). Der Wnt/PCP-Signalweg kontrolliert die Funktionen und Struktur von Geweben durch Modulation der Zellmigration und Orientierung. Er sorgt für eine asymmetrische Verteilung von Proteinen, wie *Frizzled* (Fz), *Dishelled* (Dvl), *Prickle, Strabismus*, *Flamingo* (Fmi), *Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor* (Celsr) und Diego an der Plasmamembran. Hierdurch wird die Ausprägung einer proximal-distalen Zellpolarität (planare Polarität), ein asymmetrischer Aufbau des Zytoskeletts (Benzing, Simons et al. 2007), sowie die Regulation der Ziliogenese (Park, Haigo et al. 2006, Heydeck and Liu 2011) gewährleistet. Des Weiteren reguliert der Wnt-PCP auch die Ausrich-

tung der Mitosespindel, womit ein Bezug des PCP-*Pathways* zu Differenzierungsprozessen und zum Zellzyklus besteht (Benzing, Simons et al. 2007).

Die dargestellten vielfältigen Verflechtungen des (P)RR mit den Wnt-Signalwegen könnten erklären, weshalb ein (P)RR-*Knockout* bei Mäusen mit dem Leben nicht vereinbar ist (Wendling, Champy et al. 2017). Auf die Niere bezogen zeigt sich, dass Wnt-Defekte an Erkrankungen wie Fibrose, Tumore, Ausbildung von Zysten und diabetischer Nephropathie beteiligt sind (Pulkkinen, Murugan et al. 2008, Schmidt-Ott and Barasch 2008, He, Dai et al. 2009). Auf der Suche nach weiteren Funktionen und signifikanten Signalwegen des (P)RR in der Niere wurde daher nach (P)RR-*Downregulation* in renalen, (Pro)Renin-produzierenden As4.1 Zellen eine unselektive genomweite Transkriptomanalyse durchgeführt.

1.2. Transkriptomanalyse in As4.1 Zellen

As4.1 Zellen entstammen einem intra-parenchymalen Nierentumor einer transgenen Maus und tragen das Renin-SV40 T-Antigen-Fusionsgen pR2d4.6TAG (Information von ATCC). Daher sezernieren die Zellen konstitutiv Prorenin und speichern aktives Renin in intrazellulären Sekretionsgranula. Western-Blot und FACS-Analysen sowie Fluoreszenzmikroskopie belegen, dass bei diesen Zellen der Volllänger-(P)RR, der s(P)RR und das M8.9 Fragment vorhanden sind, wobei der (P)RR bevorzugt intrazellulär lokalisiert ist (Abb.1.3).

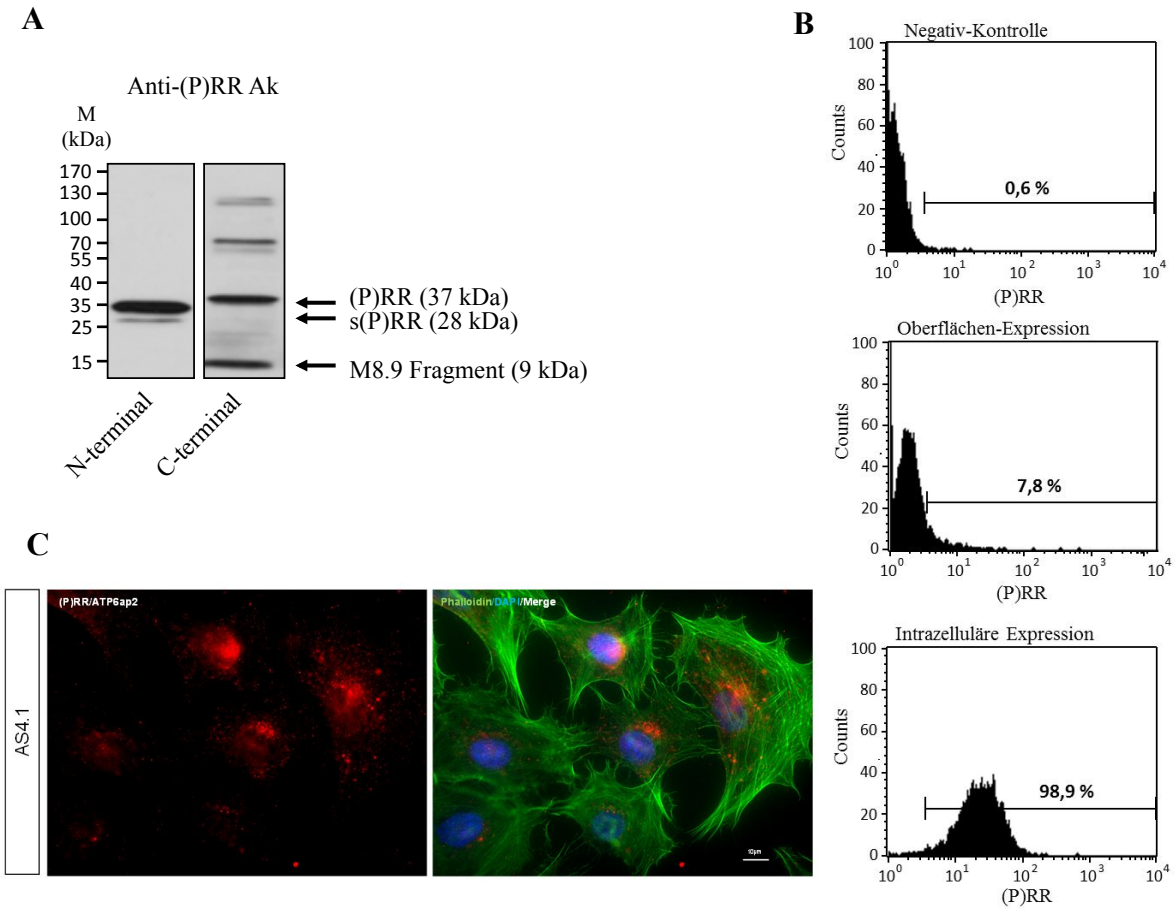


Abb. 1.3 Verteilung und Fragmente des (P)RR

Hier dargestellt sind (A) die verschiedenen Fragmente des (P)RR, die zelluläre Verteilung gemäß FACS-Analyse (B) mit prozentualer Verteilung gemäß der AUC (*area under the curve*) und eine exemplarische Fluoreszenzfärbung (rot=(P)RR, C).

Durch siRNA-Interferenz konnte die Expression aller Domänen des (P)RR effizient *downreguliert* werden (Wanka, Lutze et al. 2017). Die nachfolgende Transkriptomanalyse ergab bei Zellen nach 24-stündiger (P)RR-*Downregulation* die differentielle Expression von 586 mRNAs, wobei nach Verschärfung der Analysekriterien 28 Transkripte übrig blieben. Eine Vielzahl dieser Transkripte zeigte einerseits eine Assoziation zu grundlegenden Zilienbestandteilen bzw. Funktionen, deren Namensgebung teilweise auf phänotypischen Ziliopathien beruht und andererseits zum Zellzyklus und Tumoren (Abb. 1.4).

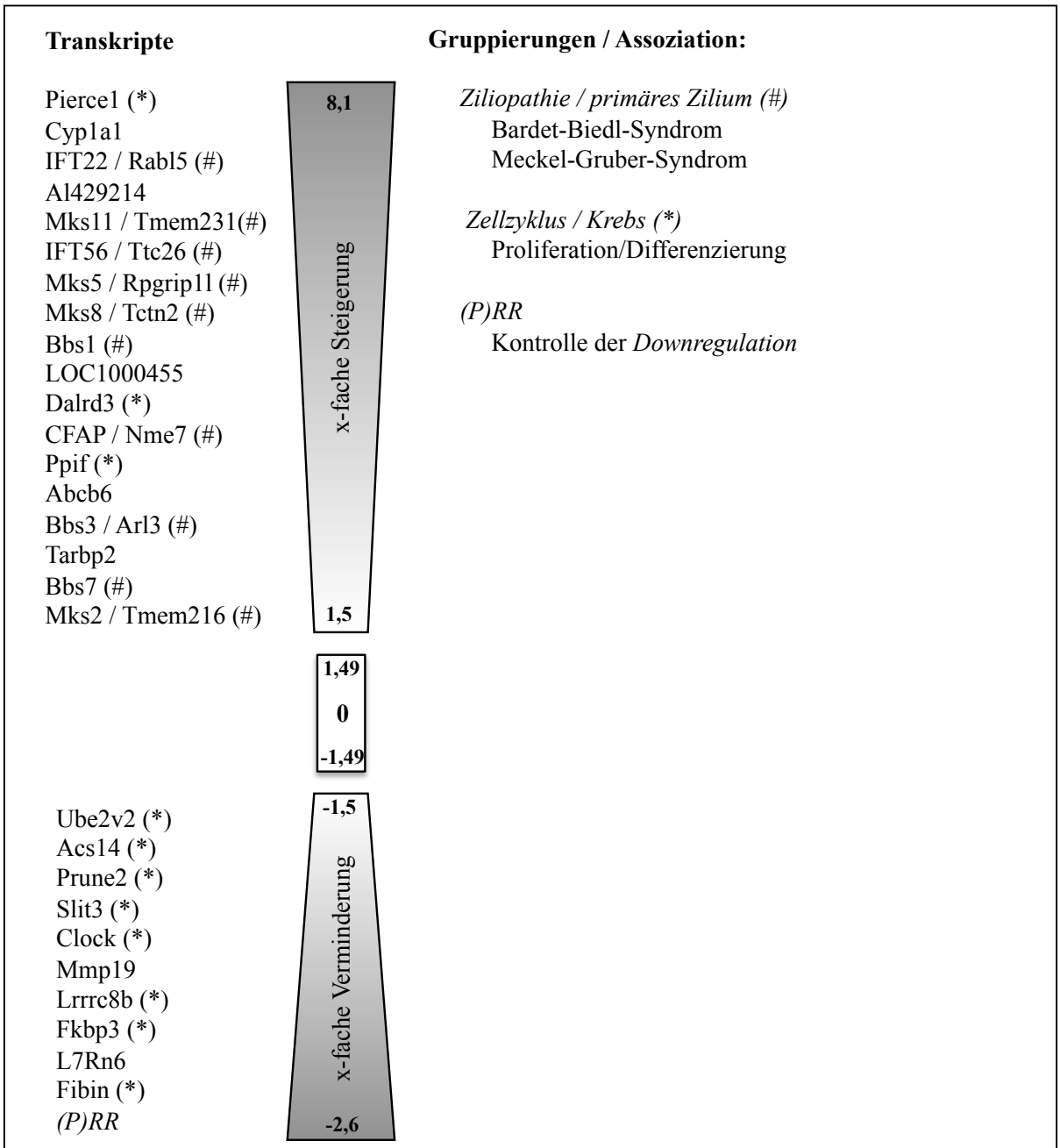


Abb. 1.4 Transkriptomanalyse unter (P)RR *Downregulation*

Signifikant veränderte Transkripte, sortiert nach x-facher Veränderung und unterteilt in funktionelle Gruppen. Versuchsdurchläufe: n=3, Vergleich von *Scramble* RNA vs. siRNA mindestens 1,5-fache Veränderung, ohne statistischen Test

1.3. Das primäre Zilium

Wie bereits durch Gürster zusammengefasst, handelt es sich bei den Zilien um antennenartige Organellen der Zellmembran, wobei zwischen den motilen und den immotilen Zilien unterschieden werden muss. Das primäre Zilium gehört zu den immotilen Zilien und ist auf fast allen Zelltypen zu finden (Pan, Wang et al. 2005). Es ragt auf der apikalen Seite der Zelle in den Extrazellulärraum bzw. in das Lumen renaler Tubuli. Dort fungiert es als Mechano- und Chemosensor (Benzing and Walz 2006), kann aber auch Informationen über andere extrazelluläre Reize wie Osmolarität, Temperatur (Phua, Lin et al. 2015) oder Schwerkraft (Moorman and Shorr 2008) an die Zelle weiterleiten. Neben der sensorischen Funktion, ist eine spezielle Form des primären Ziliums (nodales Zilium) an der Rechts-Links-Achsenausbildung während der Embryonalentwicklung von Vertebraten beteiligt und damit integrales Bestandteil der Entwicklung von Leber, Magen, Herz, Nieren und Gehirn (Basu and Brueckner 2008). In der Niere resultieren Defekte des primären Ziliums in einer Vielzahl von Ziliopathien darunter die *Polycystic Kidney Disease* (PKD) (Lin, Hiesberger et al. 2003, Hildebrandt, Attanasio et al. 2009). Die ziliäre Integrität scheint somit für den Erhalt tubulärer Strukturen in der Niere von entscheidender Bedeutung zu sein (Gürster 2013).

Darüberhinaus ist die PKD auch mit einer Störung des Wnt/PCP Signalweges assoziiert (Luyten, Su et al. 2010). Eine mögliche Verbindung zwischen dem Zilium und den Wnt-Signalwegen stellt das Protein *Inversin* (Inv) dar. Inv reduziert den zytosolischen – aber nicht den Membran-gebundenen Anteil des Wnt-Proteins *Dishelled* (Dvl). Sowohl Dvl und Inv modulieren zwischen kanonischem und Wnt/PCP *Pathway* (Simons, Gloy et al. 2005, Park, Mitchell et al. 2008, Lee, Shi et al. 2015). Bei Patienten mit Nephronophthisis Typ 2 und bei Inv-*Knockout* Mäusen ist die Mutation von Inv phänotypisch mit der Ausbildung von Nierenzysten und Links-Rechts-Achsenabnormalitäten assoziiert (Phillips, Miller et al. 2004).

Eine weitere Verbindung zwischen primärem Zilium und den Wnt-Signalwegen ergibt sich zudem aus der ziliären bzw. basalkörperassoziierten Lokalisation verschiedener Wnt-Komponenten. Hierzu zählen neben dem zuvor genannten Inv (Morgan, Eley et al. 2002, Simons, Gloy et al. 2005) auch die PCP Proteine *Vangl 2* (Ross, May-Simera et al. 2005), *Protocadherin 4* (Fat4) (Saburi, Hester et al. 2008), sowie die Wnt/ß-Catenin Proteine GSK3 (Wilson and Lefebvre 2004) und *Adenomatous Polyposis Coli Protein* (APC) (Corbit, Shyer et al. 2008).

Das primäre Zilium ist nicht konstant ausgebildet, sondern unterliegt in den meisten Zellen einem zellzyklusabhängigem ständigen Wechsel von Neubildung und Abbau (Plotnikova, Pugacheva et al. 2009). Die Bildung erfolgt während der G0/G1-Phase und der ziliäre Abbau

während des Übergangs von der G2-Phase in die Mitosephase (Rieder, Jensen et al. 1979). Der ziliäre Aufbau wird durch den antegraden-, der Abbau vom retrograden Transport ziliärer Proteine begleitet. Hierbei werden die Bestandteile über die Transitionszone und den Basalkörper in das Zilium im-, bzw. exportiert. Der Basalkörper leitet sich von der Mutter-Zentriole ab, wird nach Freisetzung aus dem Ziliumverbund dupliziert und ist als mikrotubuläres Organisationszentrum (MTOC) an der Ausbildung der Mitosespindel beteiligt (Rodrigues-Martins, Riparbelli et al. 2007, Plotnikova, Pugacheva et al. 2009).

1.4. Der Zellzyklus

Neben der zyklusabhängigen Expression des primären Ziliums, deutet die Verminderung mehrerer assoziierter Transkripte unter (P)RR *Downregulation* auf eine mögliche Interaktion mit dem Zellzyklus hin. Wie von Buselmaier und Niehrs vereinfacht zusammengefasst, ist der Zellzyklus ein repetetiver Ablauf der sich reproduzierenden Zelle. Dieser lässt sich je nach stattfindendem Vorgang in unterschiedliche Phasen einteilen. Die Teilung von einer - in zwei Zellen geschieht während der Mitose, welche als M-Phase bezeichnet wird. Hiernach befindet sich die Zelle zunächst in der Wachstumsphase G1- Phase und geht dann in die S-Phase über, in welcher die zuvor getrennten Chromatiden repliziert werden. In der abschließenden G2-Phase werden die vorhandenen Zellbausteine überprüft und die Zelle ggf. für die erneute Mitose freigegeben. Ein Sonderfall ist die G0-Phase, der für Zellen ein Ruhezustand vor Synthese des zweiten Chromatides darstellt. Für einen geregelten Zellzyklus bestehen, mit Ausnahme von S zu G2, jeweils Kontrollpunkte (M-G1/G0, G1-S, G2-M). Für die Passage dieser Kontrollpunte sind verschiedene Cycline notwendig, zudem müssen supprimierende Kontrollmechanismen (z.B. p53) überwunden werden (Buselmaier 2009, Niehrs and Acebron 2012).

In Bezug auf die zuvor beschriebenen Wnt-Signalkaskaden (s.S.8 ff) liegt, durch übereinstimmende Ergebnisse mehrerer Studien, eine pro-proliferative Wirkung des kanonischen Wnt nahe (Niehrs and Acebron 2012, Bryja, Cervenka et al. 2017). Auf Seiten des Wnt-PCP deutet sich ebenfalls ein pro-proliferativer Effekt an, nachdem erstens eine Überexpression des Ko-Rezeptors *Vangl 2* zu einer vermehrten Proliferation und größeren Tumoren führte (Puvirajesinghe, Bertucci et al. 2016) und zweitens essentielle PCP Bestandteile in Brustkrebszellen überexprimiert sind (Asad, Wong et al. 2014, zusammengefasst in Daulat and Borg 2017).

Insgesamt deuten sich durch die bekannte (P)RR Interaktion mit den Wnt-Signalwegen, sowie deren Zusammenhang zum Zellzyklus und der zellulären Polarität, nun mit den Ergebnissen der unselektiven Transkriptomanalyse, Auswirkungen des (P)RR auf zilien- und zellzyklusassoziierte Transkripte an.
Um diese Hypothese zu bestätigen, bedurfte es weiterer Untersuchungen die Gegenstand der vorliegenden Promotionsschrift sind.

1.5. Zielstellung der Arbeit

Basierend auf der Transkriptomanalyse sollten die erhobenen Daten zunächst durch gezielte RT-PCRs validiert werden. Im Kontext der (P)RR-*Downregulation* sollen auf diese Weise neue Informationen zur (patho)physiologischen Funktion des (P)RRs in renalen As4.1 Zellen gewonnen werden. Auf dieser Grundlage sollte anschließend geprüft werden, welche Relevanz der (P)RR auf die einleitend beschriebene funktionelle Verbindung von Zilium und Zellzyklus hat. Diese Untersuchungen sind nicht nur zur Aufklärung der Pathomechanismen bei Ziliopathien, sondern auch für die Tumorforschung bedeutsam. Der Schwerpunkt der Arbeit lag daher in folgenden Aspekten und Fragestellungen:

1. **Validierung der Daten der Transkriptomuntersuchung durch zeitabhängige Analysen der mRNA-Gehalte spezifischer Zilien-assoziierter Proteine**

Da die Daten der Transkriptomanalyse einen ersten Zusammenhang zwischen (P)RR-*Downregulation* und gruppierten Transkriptmengenänderungen nahelegen, sollten diese im Rahmen dieser Arbeit im Zeitverlauf (12-72 h nach (P)RR-*Downregulation*) validiert werden. Hierzu zählen zum einen die unter (P)RR *Downregulation* vermehrten mRNA Mengen rund um das primäre Zilium, sowie zum anderen die vorrangig vermindert transkribierten Sequenzen des Zellzyklus'.

2. **Hat die (P)RR-*Downregulation* Einfluss auf die Zilienexpression / den Zellzyklus und andersherum die Proliferationsrate einen Einfluss auf den (P)RR?**

Durch fluoreszenzmikroskopische Darstellung des primären Ziliums, sowie Proliferations- und Zellzyklusanalysen sollte die Konsequenz und biologische Relevanz der (P)RR *Downregulation* kontrolliert werden. Um wechselseitige Auswirkungen des Zellzyklus auf den (P)RR zu prüfen, sollte durch externe Manipulation ein Zellzyklusarrest und/oder eine veränderte Proliferationsrate induziert und die Konsequenz auf die (P)RR Menge gemessen werden.

3. **Beeinflusst die (P)RR-*Downregulation* die Expression Wnt-relevanter Transkripte?**

Nachfolgend sollte durch PCR-Analysen von Wnt-assoziierten Transkripten und Wnt-Zielgenen eruiert werden, ob und welcher Wnt-*Pathway* in den Veränderungen involviert sein könnte.

2. Material und Methoden

Da es sich bei den durchgeführten Methoden um standartisierte Prozesse der Arbeitsgruppe Peters (Institut für Physiologie, Greifswald) handelt, sind Abläufe, Zusammensetzungen, Geräte und damit auch die Beschreibung letzterer in vielen Teilen ähnlich oder deckungsgleich mit vorherigen Arbeiten aus der Arbeitsgruppe (Schäfer 2014, Morch 2019).

2.1. Material

Zellkultur

Kulturmedium	As4.1 Zellen DMEM mit 25mM Glutamat, Na-Pyruvat, Glucose Zusätzlich: 10% hitzeinaktiviertes FKS, 100U/ml Penicillin
Trypsin EDTA Lösung	0,5%/0,2%
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, PAN Biontech, Deutschland
Einfriermedium	2,8ml DMEM, 1,5ml hitzeinaktiviertes FKS 0,7ml DMSO
Metafectene	Biontex, Deutschland

Zelllinie

As 4.1	Nierentumorzelle der Maus Jones CA, Sigmund CD, McGowan RA, Kane-Haas CM, Gross KW, 1990

Polymerasekettenreaktion

Agarose Gel (2%)	6g Agarose (2% Seakern LE Agarose), 300ml TBE- Puffer, 10µg Ethidiumbromid
TE Puffer	10mmol/l TRIS Base, 1mmol/ EDTA, titriert auf pH 8
TBE Puffer	121g TRIS Base, 55g Borsäure, 8,3g EDTA ad 1l Aqua bidest

Western Blot

Sammelgel (7%)	3ml H_2O, 0,65ml Acrylamid (30%) 1,23ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 50µl SDS (10%) 50µl APS (10%), 5µl TEMED
Trenngel (10%)	1,364 ml H_2O, 1,667ml Acrylamid (30%) 1,875ml 1,5M Tris- HCl (pH 8,8), 50µl SDS (10%) 40µl APS (10%), 4µl TEMED

RIPA Lyse Puffer Stamm	5ml 1M Tris (pH 7,5), 1ml 0,5M EDTA (pH 8), 3ml 5M NaCl 1ml 1M K_2HPO_4,10ml 99,5% Glycerol, 1ml Triton X-100, 1ml SDS (10%) ad 100ml Aqua bidest (A. bd)
RIPA Lyse Puffer Gebrauch	670 µl RIPA-Stammlösung, 10µl Na_3VO_4, 20µl NaF 1µl 0,1M PSMF, 20 µl Glycerol-2-Phosphat 40µl Complete (5mg/ml)
TES Puffer	22,9g TES (100mM), 3,22g EDTA (10mM), 0,1g Neomycin Ad 80ml A.bd., titriert auf pH 7,2
Anodenpuffer	40ml Rotiblot A, 80ml Methanol ad 280ml A. bd
Kathodenpuffer	40ml Rotiblot B, 80ml Methanol ad 280ml A. bd
Laufpuffer	30,3g Tris Base, 144,1g Glycin, (10g 10% SDS) ad 1l A. bd
Transferpuffer	100ml Laufpuffer (10x), 200ml Methanol ad 700ml A. bd
TBS (10x)	60,57g Tris (50mM), 87,66g NaCl ad 1l A. bd, titriert pH 7,4
TBST	100ml 10x TBS (pH 7,4), 1ml Tween-20 ad 899ml A. bd
Entwicklungsreagenz	4ml Solution A: 500ml Tris-Hcl (0,1M), 125mg Luminol 400µl Solution B: 11mg p-Hydroxy-coumarinsäure, 10ml DMSO 1µl H_2O_2 (30%)
Marker	Page Ruler, Thermo Fisher Scientific, USA
Stripping Buffer	Restore Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific, USA
N-terminaler Antikörper	Prestige Antibodies ATP6ap2, Sigma Aldrich, USA

Lösungen für die Immunflluoreszenz

FACS Stammlösung	80g NaCl, 2g KCl, 2g Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 10g NaN_3 ad 1l A.bd.
FACS Puffer	200 ml FACS-Stammlösung 20 ml FKS ad 1,8 l Aqua bidest
Annexin Binding Puffer	23,8mg HEPES (10 mM), 818,2mg NaCl, 36,76mg $CaCl_2$ ad 100ml A. bd. titriert auf pH 7,4
Hank A	160g NaCl, 8g KCl, 2,8 g $CaCl_2$ oder 3,7 g $CaCl_2$ x 2 H_2O 4g$MgSO_4$ x7H_2O ad 1l A. bd
Hank B	7g $NaHCO_3$,1,2g Na_2PO_4 x 2 H_2O,1,2 g KH_2PO_4, 18g Glucose, 2g Albumin, 1,2g Penicillin, 2,9g Streptomycin ad 1l A. bd.
Hank Gebrauchslösung	50ml Hank A, 50ml Hank B, ad 900ml A. bd.

Lösungen für die FACS

2% Paraformaldehydlösung	2g Paraformaldehyd, 80ml A. bd. 3 Tropfen NaOH (1M), bei 50°C auf einer Heizplatte lösen
Block Lösung	2% hitzeinaktiviertes FKS, 2% BSA, 0,2% Fischgelatine ad PBS
Mowiol Mounting Medium	40ml PBS, 10g Moviol über Nacht gerührt, 20g Glycerol 8-10h gerührt, 15min zentrifugiert

Feinmechaniken

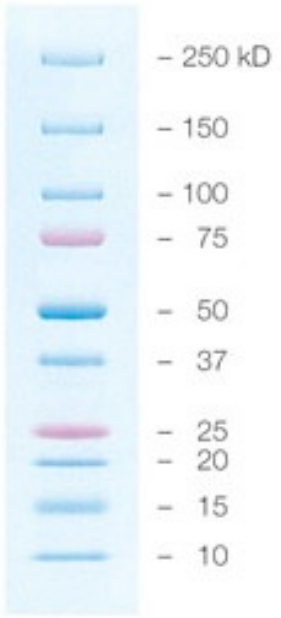
Aqua bidest. (A. bd)	Stratagene, USA
Borsäure	Roth, Deutschland
BSA	Thermo Fisher Scientific, USA
Coomassie Brilliant Blau	Roth, Deutschland

DMEM	Gibco, Life Technologies, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz	Roth, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Deutschland
0,2 % Fischgelatine	Sigma-Aldrich, Deutschland
FKS	Gibco, Life Technologies, Deutschland
Geneticin (G418)	Serva Feinbiochemica, GmbH & Co. Deutschland
LE Agarose	Gibco, Life Technologies, Deutschland
Mercaptoethanol	Stratagene, USA
NaCl	Roth, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich, Deutschland
Penicillin	Gibco, Life Technologies, Deutschland
PonceauS	AppliChem, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Pferdeserum (PS)	Life-Technologies, Deutschland
RPMI-Medium	MP Biomedicals, Deutschland
SDS Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deutschland
SYBR Green	Stragene, USA
TRIS Puffer	Roth, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,5%	Serva, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypton	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween-20	AppliChem, Deutschland

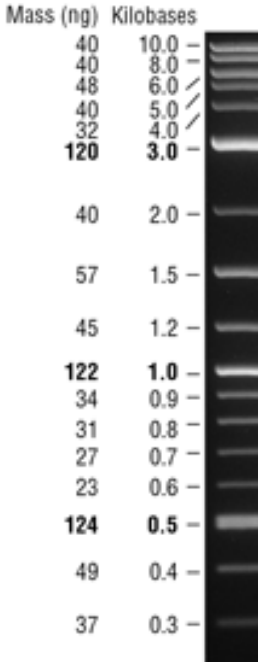
Industrielle Kits

High Capacity cDNA RT Kit	Promega, USA
RNaesy Mini Kit	Qiagen, Deutschland
Quick RNA Mini-Prep	Zymo Research, USA

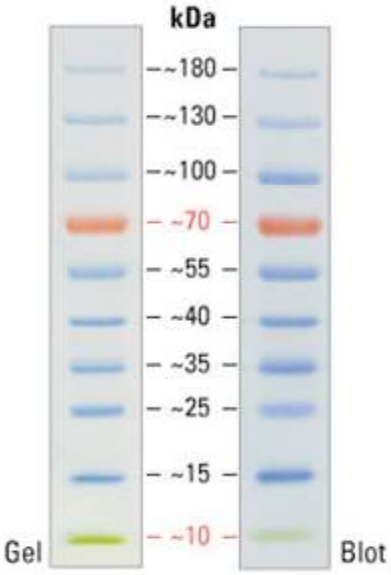
Größenstandarts



Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, Deutschland)



2log- DNA Ladder (0,1-10,0 kbp) (BioLabs, England)



Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)

Apparaturen und technische Geräte

Microplate Luminometer LB96V	EG&G Berthold, Deutschland
Heracell 240i CO_2 Inkubator	Thermo Scientific, USA
Herasafe Sterilwerkbank	Heraes Instruments, Deutschland
Sure Cycler 880	Agilent, Technologies, USA
Gene Amp 5700 Sequencer Detector	Applied Biosystems, USA
DC PowerSupply PS3000	Hoefer, USA
Leica TCS SP 52	Leica Microsystems, Deutschland
BZ-9000	Keyence, Japan
Axioplan 2 Imaging	Carl-Zeiss, Deutschland
Mini Pro Tean 2 Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Deutschland
SureLock Mini-Cell Elektrophoresekammer	Life Technologies, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Deutschland
Citerion Blotter	Bio-Rad, Deutschland
Fluostar Optima	BMG Labtech, Deutschland
Molecular Imager Chemidoc	Bio-Rad, Deutschland
Rotor Gene Q	Qiagen, Deutschland
Gene Quant Pro	GE Healthcare Life Sciences, USA
BIOSEN C line GP+	EKF Diagnostik, Deutschland

Software

Rotor Gene Q Series	Qiagen, Deutschland
Image Lab	Bio-Rad, Deutschland
Quantity One	Bio-Rad, Deutschland
Gelscan V5.02	Bioscitec, Deutschland
Cellquest	Beckton Dickinson, USA

2.2. Methoden

Zellkultur

Erhaltungskultur der As4.1 Zellen

Bei den hier eingesetzten murinen As4.1 Zellen (CRL-2193, ATCC, Manassas, USA) handelt es sich um renale (Pro)Renin-produzierende Zellen, die ursprünglich aus einem Tumor isoliert wurden. Aliquote dieser Zellen wurden in einem CryoSafe bei -150°C gelagert und standen bei Bedarf zur Verfügung. Für die Versuche wurden die eingefrorenen Zellen langsam aufgetaut und anschließend in ein Röhrchen mit 10ml Dulbecco's Modified Eagle's Kulturmedium (DMEM, Lonza, Basel, Schweiz) überführt. Das DMEM supplementiert mit den Additiven 10% fetales Kälber-Serum (FKS, PAN, Biotech, Darmstadt, Deutschland), 100U/l Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) diente hier zur Verdünnung des Einfriermediums und gewährleistete in der Erhaltungskultur optimale Wachstumsbedingungen. Nach Zentrifugation der aufgetauten Zellen bei 1000U/min für 5min, wurde das Zellpellet in 2ml DMEM resuspendiert und die Zellzahl und Vitalität am Mikroskop bestimmt. Anschließend wurden die As4.1 Zellen in 75cm^2 Kulturflaschen (Greiner Bio One) überführt und im Inkubator bei 5 % CO_2 und 37°C vermehrt.

Bei dieser sogenannten Erhaltungskultur wurde das Kulturmedium der adhärenten As4.1 Zellen zweimal wöchentlich dekantiert und durch frisches DMEM ersetzt. Das Passagieren der Zellen erfolgte 1x pro Woche. Dazu wurde das DMEM dekantiert, die Zellen mit 5ml einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) (PAN Biotech) überspült und für 5min einer Trypsin/EDTA Lösung (GIBCO) bei 37°C ausgesetzt. Dabei kommt es zur Destabilisierung der Bindung der Cadherine und Integrine, sodass sich die adhärenten Zellen vom Flaschenboden ablösen. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die abgelösten Zellklumpen mechanisch vereinzelt. Die Trypsinierung wurde durch Überführen der Zellsuspensionen in ein Röhrchen mit 5ml Kulturmedium gestoppt. Nach Pelletierung der Zellsuspension durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000U/min und Resuspendierung der Zellen in 2ml DMEM, erfolgte anschließend die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität am Mikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer. Für die Vitalitätsuntersuchungen kam der Farbstoff Trypanblau zum Einsatz, mit dem geschädigte Zellen blau gefärbt werden, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Hierzu wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl einer 30%igen Trypanblaulösung gemischt, in die Neubauer-Zählkammer überführt und der prozentuale Anteil der ungefärbten Zellen ermittelt. Alle Kulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einem S2-Labor. Für

die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden $0{,}2x10^6$ vitale Zellen pro 2ml DMEM in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät und in der Regel für 3 Tage bei 37°C im CO_2 Inkubator kultiviert, um eine optimale Zelldichte zu erzielen.

(P)RR-*Downregulation*

Für die *Downregulation* des (P)RR wurde die RNA-Interferenz Methode eingesetzt. Um die siRNA in die Zellen zu transfizieren, wurde das Liposome Metafektene Pro als Transfektionsreagenz eingesetzt. Metafectene bildet in wässriger Lösung Komplexe mit Nukleinsäuren. Durch Fusion mit der Zellmembran gelangt dann die siRNA in die Zelle. Für die Versuche wurden $2x10^5$ As4.1 Zellen pro Kavität in einer 6-Loch Platte nach einer Anwachsphase von 3 Tagen (Zellkonfluenz etwa 80%) mit einer murinen siRNA gegen den (P)RR (siGENOM SMART pool siRNA D-063641-04, ATP6ap2, Thermo Scientific) behandelt (Abb. 2.1).
Vor Beginn der Transfektion wurden zunächst alle benötigten Medien und Substanzen auf

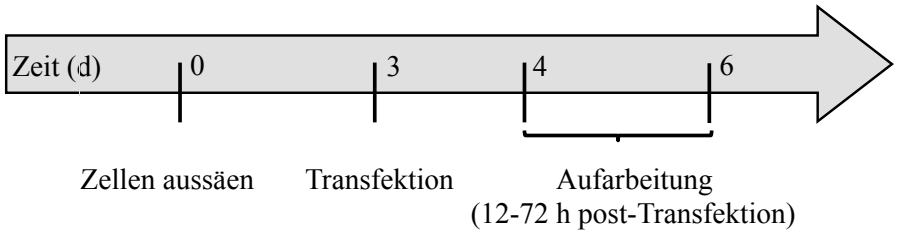


Abbildung 2.1 Zeitlicher Ablauf der (P)RR-*Downregulation*
Nach dreitägiger Anwachsphase folgte die Transfektion der As4.1 Zellen mit siRNA gegen den (P)RR. Die nachfolgenden Analysen wurden nach weiteren 12 bis 72 h Kulturdauer durchgeführt.

Raumtemperatur erwärmt. Die Transfektionsansätze setzten sich, wie nachfolgend dokumentiert, aus OptiMEM (GIBCO), einem speziell für die Transfektion entwickelten Medium, dem Transfektionsreagenz Metafectene Pro (Biontex) und dem FKS-reduzierten DMEM (2%) zusammen:

1) Kontrolle: 2,0 ml DMEM mit 2% FKS
2) Transfektionskontrolle: 1,80 ml DMEM mit 2% FKS
   + 190 µl OptiMEM und 10 µl Metafectene Pro
3) *Scramble* Kontrolle: 1,79 ml DMEM mit 2% FKS
   + 190 µl OptiMEM, 10 µl Metafectene Pro und 10 µl *scramble* siRNA (nonsens siRNA, ThermoFischer)
4) si(P)RR Ansatz: 1,79 ml DMEM mit 2% FKS

+ 190 µl OptiMEM, 10 µl Metafectene Pro und 10 µl anti-ATP6ap2 siRNA (40 nM)

Für die Generierung der siRNA-Metafectene-Komplexe wurden zunächst je 10µl Metafectene mit 190µl OptiMEM in einem Eppendorfbecher vermischt. Nach einer kurzen Inkubationsphase von 5min wurde die *scramble* siRNA bzw. die anti-ATP6ap2 siRNA zugesetzt, gut gemischt und dieses Gemisch zur Komplexierung für weitere 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden anschließend vorsichtig zu den Zellen pipettiert, bei denen im Vorfeld ein Mediumwechsel (DMEM mit 2% FKS) durchgeführt wurde. Die eigentliche Transfektion, bei der die siRNA durch die Zellen aufgenommen wird, dauerte 6 Stunden und erfolgte im CO_2 Inkubator bei 37°C. Um potenzielle toxische Effekte des Transfektionsreagenzes zu reduzieren wurde hiernach ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen anschließend für weitere 6h bis 66h in DMEM- Komplettmedium im CO_2 Inkubator inkubiert. Die RT-PCR und Western Blot Analysen der Zellen erfolgte somit 12h bis 72h nach Start der Transfektion.

(P)RR-Expression im Zeitverlauf

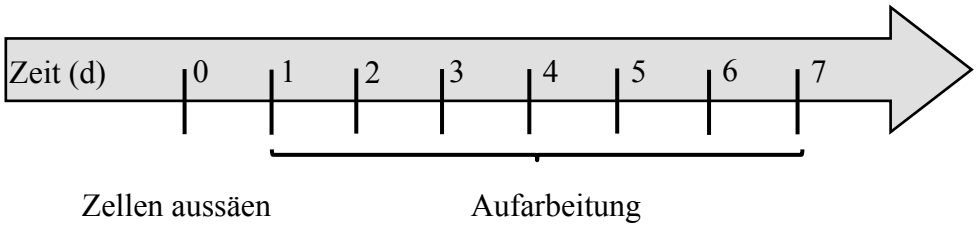


Abbildung 2.2 Analyse der (P)RR-Expression im Zeitverlauf

Die tägliche Aufarbeitung begann bereits einen Tag nach Aussaat. Die Zellen wurden mit bzw. ohne täglichen Wechsel mit DMEM kultiviert.

Um zu überprüfen, inwieweit die (P)RR-Expression von der Zelldichte pro Kavität der Kulturplatte und damit möglicherweise durch den Zellzyklus bestimmt wird, wurden initial $2x10^6$ As4.1 Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät. Während eines Zeitraumes von 7 Tagen erfolgte eine tägliche Aufarbeitung der Zellen. Zusätzlich wurde geprüft, ob die Zusammensetzung des Mediums für die (P)RR-Expression relevant ist. Daher wurde in einer Gruppe das Medium täglich erneuert, während in der anderen Gruppe kein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden nicht nur PCR- und Western Blot Analysen, sondern auch metabolische Parameter wie die Glukose- und die Laktatkonzentrationen bestimmt.

Arretierung der Zellzyklusphase durch Serumvariation

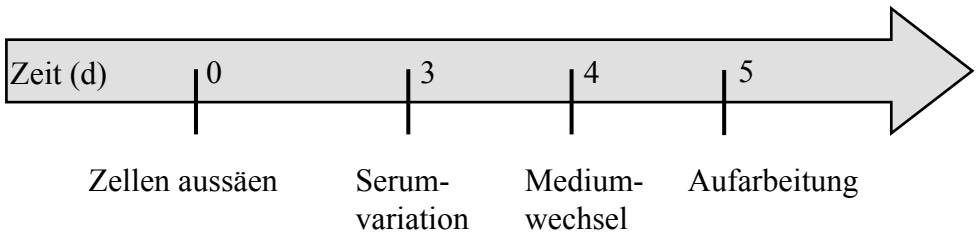


Abbildung 2.3 Zeitlicher Ablauf der Zellzyklus-Arretierung

Nach dreitägigem regulären Wachstum wurden die As4.1 Zellen in Medium mit unterschiedlicher FKS-Konzentration (10% vs. 0,5%) inkubiert und anschließend analysiert.

Durch Entzug des fetalen Kälberserums (FKS) und den darin enthaltenden notwendigen Wachstumsfaktoren können proliferierende Zellen im Zellzyklus arretiert und nach Zusatz von FKS in ihrem Proliferationsverhalten synchronisiert werden. Für diese Versuche wurden $2x10^5$ As4.1 Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Kulturplatte oder $1x10^4$ Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Platte eine drei-tägige Anwachsphase im CO_2 Inkubator gewährt. Anschließend wurden drei Versuchsgruppen eingeteilt:

1) As4.1 Zellen, die für weitere 48 h mit Vollmedium kultiviert wurden
2) Zellen, denen für 24 h das FKS stark reduziert wurde (0,5 %) und für weiteren 24 h wieder zugesetzt wurde (Synchronisierung des Zellzyklus)
3) Zellen, die für 48 h in DMEM mit 0,5% FKS inkubiert wurden.

Bei diesen Zellen wurden nachfolgend neben der Zellzahl und der Vitalität folgende Parameter bestimmt: (P)RR-Expression durch RT-PCR und Western Blot Analysen, der prozentuale Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen (Durchflusszytometrie), der Anteil ziliierter Zellen (Fluoreszenzmikroskopie) und die Proliferation (BrdU-Einbau).

Einfluss des extrazellulären Laktats auf die (P)RR-Expression

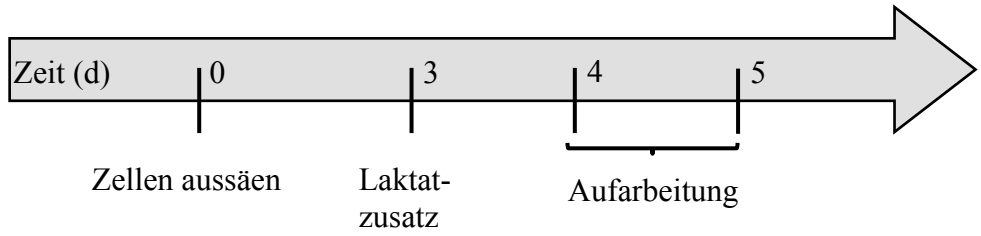


Abbildung 2.4 Zeitablauf der Laktatstimulation

Nach einer drei-tägigen Anwachsphase wurden die As4.1 Zellen extrazellulären Laktatkonzentrationen von 5mM bis 30 mM ausgesetzt. Nach 1 bzw. 2 Tagen wurden die Zellen auf Veränderungen der (P)RR-Expression untersucht.

Während der Zellkultur kommt es durch aerobe Glykolyse zur Anreicherung von Laktat im Kulturmedium. Daher wurde überprüft, ob die extrazelluläre Laktatkonzentration einen Einfluss auf die (P)RR-Expression hat. Für die Versuche wurden $2x10^5$ As4.1 Zellen nach einer Anwachsphase von drei Tagen mit Laktatkonzentrationen von 5mM bis 30mM konfrontiert. Nach Inkubationszeiten von 24h und 48 h im CO_2 Inkubator wurden die Zellen zur Analyse der (P)RR Expression aufgearbeitet. Zusätzlich wurden die Glukose- und Laktatkonzentrationen im DMEM und sowie die Proliferation der Zellen bestimmt.

Molekularbiologischer Nachweis von Transkriptmengen

Die Analysen zur Genexpression erfolgen in der Regel mit Hilfe der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur exponentiellen Verfielfältigung einer spezifischen Ausgangs-DNA.

RNA Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurde der säulenbasierte Quick-RNA Mini Prep Kit *(*Zymo Research) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte bei 4°C. Der RNA-Gehalt der Proben wurde nach einer 1:25 Verdünnung mit TE-Puffer bestehend aus 10mmol/l TRIS Base und 1 mmol/l EDTA, pH 8,0 am GeneQuant Pro Spektralphotometer (Biochrom) bei Wellenlängen von 260nm (Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280nm (Extinktionsmaximum von Proteinen) quantifiziert. Aus dem Quotient E_{260}/E_{280} konnte auf den Reinheitsgrad der Präparation geschlossen werden. Idealerweise soll-

te dieser Wert zwischen 1,85 und 2 liegen. Nach der RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem GeneQuant (Biochrom) wurde die extrahierte RNA bei -70°C gelagert.

cDNA Synthese

Die extrahierte RNA wurde mittels reverser Transkriptase mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription* Kit (Applied Biosystems, California, USA) in die komplementäre cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde ein Reaktionsgemisch aus 2µl RT-Puffer, 0,8µl 25x dNTP Mix, 2µl 10x RT Random Primer und 1µl reverse Transkriptase genutzt. Für die Umschreibung wurden 1,2µg RNA eingesetzt, mit 5,8µl des Reaktionsgemisches supplementiert und auf ein Endvolumen von 20µl mit Sigma-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 10min bei 25°C, dann für 2h bei 37°C und für 5min bei 85°C im Sure Cycler 8000 (Agilent Technologies) temperiert. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurden die Proben mit 180µl RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von 200µl verdünnt und bei -20°C eingefroren.

Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Bei der quantitativen *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) kommt es mithilfe der DNA-Polymerase und spezifischer Primerpaare zur Amplifizierung selektiver DNA-Abschnitte. Die Auswahl der Primersequenzen über Exon-Grenzen hinweg, hilft Fehlbestimmungen durch Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Die eingesetzten Primerpaare für die zu untersuchenden Gentranskripte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1:

Gen	Primersequenz	
	forward	*reverse*
YWHAZ	CATCTGCAACGACGTACTGTCTCT	GACTGGTCCACAATTCCTTTCTTG
(P)RR	TGGGAAGCGTTATGGAGAAG	CTTCCTCACCAGGGATGTGT
Axin 2	AGCGCCAACGACAGCGAGTT	AGGTTCCACGGGCGTCATCT
GSK-3ß	CCGAGGAGAGCCCAATGTTT	TGCTCCTGGTGAGTCCTTTG
Engrailed 2	GTTCCTTGGATGGAGTGCA	CAAAGTGTTCTTGTTGCC
Flamingo	ACCCAACCTCACAAAGGCAT	CCCAGGGTTAATGCAGGAAGT
Vangl 2	GGAAACAGGCGAGTGGTCT	GCAGCTCCCCGCCACT
Fuzzy	GACAGCTTCCTGGGGAACTC	ACCCTGAAAGGGTTTCCTGC
Inturned	CTGGTTGGCGATGTCCTTGT	ATCTTGGGTGCTCGACTGTG
Cyclin D	TGCGCGCCCTCCGTTTCTTA	AAGCTGCAGGCGGCTCTTCT
Cyclin E1	GGACACAGCTTCGGGTCTGAG	CATCCCAAGGCTGACTGCTAT

Für die Array-Analysen wurde ein *Custom mouse RT²Profiler™ PCR Array* (CAPM12033, Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt, bei dem die Primerpaare bereits vorgegeben waren.

Die Amplifizierung der DNA erfolgte in 3 Phasen:

1. die Denaturierung der DNA bei 95°C für 3min
2. die Anlagerung der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz bei 50°C für 30s
3. die Vervielfältigung der einzelner DNA-Stränge durch die *Taq*-DNA-Polymerase bei 68°C für 2min

Für die Amplifikation im Thermocycler, Sure Cycler 880, wurde das *Expand High Fidelity* (Roche Diagnostics) bzw. das *Rotor Gene System* (Quiagen Venlo, Niederlande) genutzt. Dabei durchliefen die Proben insgesamt 33 Zyklen von Denaturierung bis DNA-Vervielfältigung. Bei jedem Zyklus kam es zur Verdoppelung der DNA-Menge.
Das Reaktionsgemisch für die qRT-PCR setzte sich aus je 1µl des Vorwärts- und Rückwärtsprimers (25µmol/l), 12,5µl *SYBR® Green* Mastermix und 20ng cDNA zusammen. Es wurde mit Sigma-Wasser auf ein Endvolumen von 25µl aufgefüllt. Bei dem *SYBR® Green* handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und bei entsprechender Bestrahlung fluoresziert. Die detektierte Fluoreszenzintensität einer Probe korreliert demnach mit der Zunahme der amplifizierten DNA-Menge während der PCR-Zyklen. Parallel wurde die Reinheit der PCR-Produkte durch eine Schmelzkurvenanalyse kontrolliert, da das *SYBR® Green* auch an Primerdimere oder unspezifische PCR-Produkte binden kann. Dabei wurde bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur im PCR-Gefäß kontinuierlich erhöht. Bei einer für das spezifische PCR-Produkt charakteristischen Temperatur wurde der DNA-Doppelstrang in zwei Stränge aufgeschmolzen, das *SYBR® Green* wurde freigesetzt, die Fluoreszenz sankt - es entstand die Schmelzkurve. Der Kurvenverlauf des spezifischen PCR-Produkts unterscheidet sich dabei von unspezifischen Amplifikaten.
Für die Quantifizierung der amplifizierten DNA kam die Rotor Gene Q Series Software zum Einsatz. Da während der PCR-Zyklen die Stärke der Fluoreszenz proportional zur gebildeten DNA-Menge zunimmt, konnte der Verlauf der PCR-Reaktion direkt verfolgt werden. Im zeitlichen Verlauf der PCR-Kurve wird bei einem bestimmten Zyklus der Schwellenwert für die unspezifische Fluoreszenzemission überschritten, es kommt zur exponentiellen Zunahme der Fluoreszenz. Dieser Punkt wird als Ct-Wert bezeichnet (*cycle threshold*). Er bildet die Grund-

lage für die relative Quantifizierung des Transkriptgehaltes im Vergleich zu einem Referenz- bzw. Haushaltsgen über die Formel $2^{(-1(\text{Zielgen-Haushaltsgen})}$.

Quantifizierung des (P)RR-Proteingehalts durch Western Blot

Der Western Blot ist eine effiziente Methode zum Nachweis spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemischs z.B. einem Zelllysat. Dieses Proteingemisch wird zunächst mittels Gelelektrophorese entsprechend seiner Ladung und Größe in einzelne Banden aufgetrennt. Anschließend werden diese Proteinbanden aus dem Gel auf eine Trägermembran transferiert. Über spezifische Antikörper können dann die relevanten Proteine in einer Chemilumineszenzreaktion visualisiert werden. Die Western Blot Methode bietet dabei den Vorteil, dass man nach Entfernen des Antikörpers (*stripping*) über eine weitere Antikörperreaktion einen internen Mengenstandard (ß-Aktin) zur (Semi) Quantifizierung nutzen kann.

Probenvorbereitung

Zur Detektion des (P)RR-Proteins wurden Zellextrakte von unbehandelten und (P)RR-*downregulierten* As4.1 Zellen zunächst zweimalig mit PBS gewaschen, dann in 100 µl RIPA-Lysis Puffer aufgenommen und für 2x 10s mit Ultraschall aufgeschlossen. Zur Vermeidung einer Hitze-induzierten Denaturierung der Probe wurde der Ultraschall auf Eiswasser durchgeführt.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Da für die Gelelektrophorese eine konstante Proteinmenge eingesetzt werden sollte, wurde zunächst der Proteingehalt der Probe nach Bradford mit dem Roti-Quant Assay (Carl Roth & Co, Deutschland) bestimmt. Der Assay basiert auf der Interaktion des Coomassie Blau Farbreagenzes mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine. Dabei kommt es zu einen Farbumschlag von braun zu blau, der photometrisch bei 590 nm am Plattenreader FLUOStar OPTIMA (BMG Labtech) gemessen wurde.

Für die Proteinbestimmung wurde je 50 µl der 1:20 mit Wasser verdünnten Probe als Doppelbestimmung pro Kavität einer 96-Loch Platte transferiert. Anschließend wurden 200 µl des 2,75-fach mit DEPC-Wasser verdünnten Roti-Quant Farbstoffes pro Kavität zugesetzt und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert, bevor die Messung am Plattenreader erfolgte. Der Proteingehalt der Proben wurde anhand der Farbreaktion einer BSA-Standardkurve (Verdünnungsreihe 0-200 µg/ml) kalkuliert.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein denaturierendes Verfahren. Dabei wird durch das Detergenz SDS die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst, sodass eine elektrophoretische Proteintrennung anhand der Größe der primären Polypeptidketten ermöglicht wird.
Zur Auftrennung wurden 25µg des Proteins mit Sigma-Wasser auf eine Volumen von 24µl eingestellt und mit 6µl Ladepuffer versetzt (Proteinkonzentration: 25µg/30µl). 25µl dieses Gemisches wurden in eine Eppendorfröhrchen überführt, kurz anzentrifugiert (14.000 U/min) und für 5min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben sowie ein Größenstandard (Page Ruler Marker, BioRad) auf das selbst gegossene Elektrophoresegel aufgetragen. Bei dem Gel handelte es sich um ein diskontinuierliches Gel, bestehend aus einem 7%-igen Sammel- und einem 10%-igen Trenngel. Das Sammelgel setzte sich aus 1,23ml 0,5mol/l Tris-HCl pH 6,8, 3ml Wasser, 0,65ml 30%-igen Acrylamid, 50µl 10%-igen SDS, 50µl 10%-igen APS sowie 5µl TEMED zusammen. Das Trenngel enthielt 1,87ml 1,5mol/l Tris-HCl pH 8,8, 1,36ml Wasser, 1,67ml 30 %-iges Acrylamid, 50µl 10%-iges SDS, 40µl 10%-iges APS und 4µl TEMED. Zum Auftrennen der Proteinproben wurde das Gel in die Elektrophoresekammer transferiert und der Laufpuffer *NuPAGE® MES SDS Running Buffer* zugegeben. Durch Anlegen einer Spannung von 80V für etwa 15min wurden die Proteine zunächst im Sammelgel konzentriert. Danach wurde die Spannung auf 120V erhöht, um die Proteine im darunter liegenden Sammelgel nach iherer Größe in einem Zeitraum von 1,5-2h aufzutrennen.

Semi-Dry Blot

Nach der elektrophoretischen Trennung des Proteingemisches folgte die Übertragung der Proteinbanden vom Gel auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran im Semi-Dry Verfahren in der Blot-Apparatur. Dieser Vorgang wird als *Blotting* bezeichnet. Vorbereitend für das *Blotting* wurde die PVDF-Membran für 15s in 15ml Methanol und anschließend in Aqua Bidest geschwenkt. Zusätzlich wurden je 3 Blotpapiere in Anodenpuffer (40ml Roti-Blot A, 80ml Methanol, 280ml Aqua Bidest) und in Kathodenpuffer (40ml Roti-Blot K, 80ml Methanol, 280ml Aqua Bidest) äquilibriert. Der Blot-Aufbau in Richtung der Anode bestand aus 3 Anoden-Blotpapieren, der PVDF-Membran, dem Gel und 3 Kathoden-Blotpapieren, die luftblasenfrei übereinander positioniert wurden. Die im Gel befindlichen Proteinbanden wurden durch Anlegen einer elektrischen Stromstärke von 300mA für 90min auf die Membran trans-

feriert. Damit wurden sie den nachfolgend beschriebenen Detektionsmethoden zugänglich gemacht. Der Erfolg des Transfers wurde mit Hilfe der PonceauS-Färbung überprüft.

Immunodetektion

Nach dem *Blotting* ist es möglich bestimmte Proteine innerhalb der Proteinbanden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu identifizieren. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu minimieren, wurde die Membran zunächst für 1h bei Raumtemperatur in *Blocking*-Puffer (5% Magermilchpulver in 1x TBS-Puffer bzw. 1x RotiBlock-Lösung) inkubiert. Der TBS-Puffer setzte sich aus 60,57g TRIS und 87,66g NaCl pro 1l Aqua bidest, pH 7,4 zusammen und wurde mit 0,1% Tween-20 supplementiert. Im Anschluß folgte die Antikörperreaktion bei 4°C über Nacht. Dazu wurde der primäre 1:2.000 in TBST-Puffer verdünnte *rabbit* anti-(P)RR Antikörper (N-terminale Erkennungssequenz, Sigma Aldrich) eingesetzt. Um den ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend 3 mal 5min in TBST-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem 1:5.000 verdünnten HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierten sekundären *goat* anti-*rabbit* Antikörper für 1h bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut 3 mal 5min mit TBST-Puffer gewaschen.

Nach der, in Punkt 2.3.6. beschriebenen, Detektion ist es möglich den gebundenen Antikörper-Komplex durch *stripping* zu entfernen und die Membran mit einem anderen Antikörper, der hier als Ladungskontrolle fungiert, zu inkubieren. Dazu wurde die Expression von ß-Aktin analysiert. Für das *Stripping* wurde die Membran auf einem Wipptisch für 30-40min bei Raumtemperatur in *Stripping*-Puffer geschüttelt und der abgelöste Antikörper durch 3x 5-minütiges Waschen mit TBST-Puffer entfernt. Nach einem erneuten Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurde der primäre 1:10.000 in TBST-Puffer verdünnte anti-β-Aktin Antikörper (BioRad) für 1h auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen für 5min in TBST-Puffer folgte dann eine 1-stündige Inkubation mit dem 1:5.000 verdünnten, sekundären *goat* anti-*mouse* HRP-konjugierten Antikörper bei Raumtemperatur.

Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Das an den sekundären Antikörper gekoppeltes Enzym, die Meerettichperoxidase, katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, wobei Licht emittiert wird. Diese Lichtemission kann u.a. mittels Röntgenfilm oder einer CCD Kamera detektiert werden.
Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten in der Dunkelkammer. Hierfür wurde nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer die Membran mit 2,2ml ECL *Prime Western*

Blotting Detection Reagent beträufelt und beidseitig mit einer Klarsichtfolie bedeckt. Nach 1-minütiger Inkubation wurde das ECL Reagenz gleichmäßig ausgestrichen, 2 Röntgenfilme auf die Membran gelegt und durch Schließen der Fotokassette fixiert. Die Belichtungsdauer variierte in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper zwischen 3 und 12 Minuten ((P)RR: 12min; ß-Aktin: 3min). Anschließend wurden die Filme bis zum Auftreten der ersten Banden in der Entwicklerlösung geschwenkt, mit Leitungswasser gespült und für 1min in Fixierlösung fixiert. Zum Schluss wurde der Film erneut mit Leitungswasser gespült und an der Luft getrocknet. Die sich auf diese Weise schwarz darstellenden Proteinbanden wurden anschließend densitometrisch ausgewertet. Die zugehörigen Markerbanden wurden am Ende mit einem Eddingstift manuell auf den Film übertragen.

Alternativ wurde die Chemilumineszenzreaktion im ChemiDoc XRS System (BioRad) mittels einer CCD Kamera detektiert. Dazu wurde die Membran auf den Detektionstisch aufgelegt, 1 ml des *Clarity*^{TM} *Western* ECL-Reagenzes auf die Membran pipettiert und diese für 2min im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis im *Life Aquire* Modus über einen Mess-Zeitraum von 180s, wobei 18 Bilder aufgenommen wurden. Für die Auswertung kamen nur Bilder mit geringer Hintergrunds- und optimaler Bandenfärbung zum Einsatz.

Densitometrische Auswertung

Für die densitometrische Analyse wurde der entwickelte Film eingescannt und mit der GelScan V5.02 Analysis Software ausgewertet. Das Prinzip beruht auf der Bestimmung der Anzahl und Grauwerte belichteter Pixel in einer definierten Fläche, die die spezifische Proteinbande inklusive der Hintergrundfärbung umfasst. Durch Auftragen der Grauwerte in Abhängigkeit von der Pixel-Position in einem Histogramm kann das Flächenintegral unter der Kurve zur Berechnung des entsprechenden Proteingehaltes herangezogen wurde. Dieses Prinzip wurde analog für die Bestimmung der Bandenintensität des (P)RRs und des ß-Aktins genutzt, sodass eine Relativierung des (P)RR-Proteingehalts auf den des ß-Aktins gewährleistet wurde.
Mit dem gleichen Prinzip erfolgte die densitometrische Auswertung der am ChemiDoc erstellten Daten mit der Software ImageLab unter der Option *Volume Tool*. Das Programm quantifiziert die von der Kamera aufgezeichneten Graustufen d.h. Intensitäten der Proteinbanden (*Adjusted Volume Intensity*). Im Unterschied zur vorherigen Auswertung wurden die Ergebnisse der (P)RR Expression auf die Bandenintensität aller Banden zwischen 20-80kDa (Gesamtprotein) normiert.

Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde der (P)RR in ruhenden und proliferierenden As4.1 Zellen untersucht. Dazu wurden $2x10^4$ Zellen auf *Cover Slides* transferiert und bei 37°C für 24h im CO_2 Inkubator kultiviert. Alle im Anschluss durchgeführten Arbeiten zur Visualisierung des (P)RRs, des Zellkerns und des primären Ziliums wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen nach einem Waschschritt mit 500µl PBS zur Entfernung des Mediums für 30min in 500µl einer 2%-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Nach einem Waschschritt mit PBS erfolgte eine 5-minütige Permeabilisierung der Zellen mit 500µl einer 0,3%-igen Triton X100-PBS-Lösung gefolgt von drei weiteren Waschzyklen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen anschließend für 1h einer *Blocking*-Lösung bestehend aus 2% fetalem Rinder Serum (FBS), 2% FBS-Fraktion V und 0,2 % Fisch Gelatine ausgesetzt. Dann folgte eine 1-stündige Inkubation mit dem primären 1:500 in *Blocking*-Lösung verdünnten *rabbit* anti-(P)RR Antikörper und dem sekundären 1:500 verdünnten Alexa Fluor 596 *chicken* anti-*rabbit* Antikörper. Nach einem Waschschritt mit PBS wurden dann der Alexa Fluor 488 markierte *mouse* anti-acetylierten α-Tubulin Antikörper (500µl, 1:500 verdünnt) für 1h zugesetzt. Im letzten Schritt wurden nach Entfernung des ungebundenen Antikörpers die Zellkerne mittels 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI wurde dazu 250-fach mit PBS verdünnt, für 5min auf die Zellen aufgetragen und anschließend mit destilliertem Wasser entfernt. Der Objekträger wurde dann einer Trockenphase von etwa 15min unterzogen, bevor er unter Zusatz von Mowiol *Mounting*-Medium mit einem Deckgläschen abgedeckelt wurde. Die *Cover Slides* wurden dann bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4°C im Dunklen gelagert. Die Untersuchungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000. Bei der anschließenden Bearbeitung der Bilder kam die Software ImageJ zum Einsatz.

Funktionelle Untersuchungen

Bestimmung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion

Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden in zellfreien Kulturüberständen von As4.1 Zellen, die zuvor unter verschiedenen Kulturbedingungen inkubiert wurden, mit Hilfe des BIOSEN C line GP+ (EKF Diagnostik) bestimmt. Dazu wurden 20µl dieser Überstände in ein von der Firma vorgefülltes *Safe-Lock* Reaktionsgefäß pipettiert. Die in der Probe enthaltene D-Glukose wurde dabei durch die im Reaktionsgefäß enthaltene Glukoseoxidase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das Wasserstoffperoxid lieferte nach anodischer

Oxidation zwei Elektronen, die am Sensor ein elektrisches Signal auslösten und zur Quantifizierung der Glukosekonzentrationen verrechnet wurden. Dasselbe Prinzip lag der Bestimmung der Laktatkonzentration zugrunde, wobei hier L-Laktat durch die im Reaktionsgefäß enthaltene Laktatoxidase zu Puruvat und Wasserstoffperoxid umgesetzt wurde.
Um den Glukoseverbrauch bzw. die Laktatbildung durch die As4.1 Zellen bestimmen zu können, wurden parallel die Glukose- und Laktatkonzentrationen des DMEMs als Ausgangswert bestimmt. Die Daten des Glukoseverbrauchs bzw. der Laktatproduktion wurden anschließend auf die Zellzahl normiert.

Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde der *Cell Proliferation* ELISA (Roche, Schweiz) entsprechend den Hersteller-Angaben eingesetzt. Der Assay basiert auf dem Einbau der „falschen" Base 5-Bromo-2-Desoxy-Uridin (BrdU) anstelle von Thymidin im neu-synthetisierten DNA-Strang von proliferierenden Zellen. Die Menge des BrdU ist nachfolgend über eine Antikörperreaktion quantifizierbar.
Dazu wurden $1x10^4$ As4.1 Zellen pro Kavität einer 96 Loch-Platte in 100µl Kulturmedium als 3-facher Ansatz ausgesät und für 4h bzw 1-3 Tagen bei 37°C und 5% CO_2 im CO_2 Inkubator kultiviert. Dabei wurden die Zellen unterschiedlichen Versuchsbedingungen ausgesetzt. Zur Ermittlung der Proliferationsraten wurde den Zellen 20h vor Beendigung des Versuches 20µl einer 1:100 verdünnten BrdU-Lösung (1µmol/l) zugesetzt. Der Inkubation folgte dann die Entfernung des Zellüberstands durch Dekantieren, eine Hitze-Fixierung und eine 30-minütige Denaturierung, bei der 200µl pro Kavität einer im Kit enthaltenen FixDenat-Lösung zu den adhärenten Zellen zugesetzt wurde. Nach Entfernung der Denaturierungslösung wurden die Zellen mit 100µl der 1:100 verdünnten anti-BrdU-POD Antikörperlösung für 90min inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit je 200µl Waschlösung pro Kavität wurde der überschüssige, ungebundene Antikörper entfernt. Nach Zusatz von 100µl der POD-Substratlösung pro Kavität und 10-minütiger Inkubation unter Licht-geschützten Bedingungen bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch Zusatz von 10µl einer 1 molaren H_2SO_4 pro Kavität gestoppt. Die Quantifizierung erfolgte unmittelbar durch Messung der Absorption bei 450nm am ELISA-Plattenreader (MRX, Dynatech Laboratories Inc, USA).

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie [*Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)] ist ein Messverfahren mit dessen Hilfe bestimmte Zellparameter darunter die relative Zellgröße, die relative Granularität (interne Komplexizität), die Expression spezifischer Antigene oder der DNA-Gehalt anhand der Fluoreszenzsignale von suspendierten Einzelzellen erfasst werden können. Das Gerät besteht aus einem optischen System mit einem Laser, an dem die Einzelzellen in einer Trägerflüssigkeit vorbeigeleitet und angestrahlt werden. Die optischen Filter leiten dann die von den Zellen austretenden Lichtsignale zu den Detektoren, wo sie digitalisiert werden.

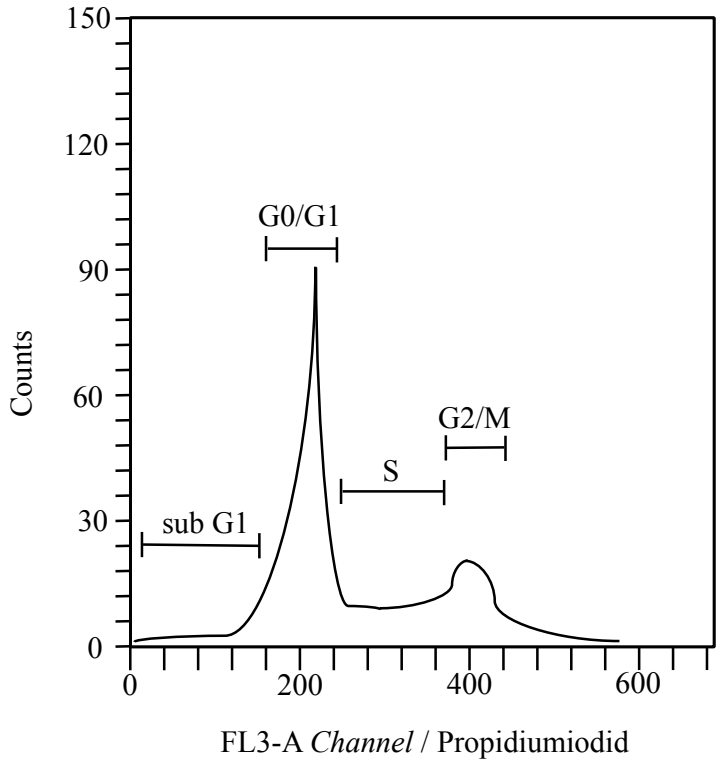


Abb. 2.5 Schematisches Verteilungsmuster von Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen

Nach Markierung mit Propidiumiodid können die Zellen in Abhängigkeit von ihrem DNA-Gehalt einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden.
subG_1: apoptotische Zellen, G0/G1: normaler Chromosomensatz, S: Synthesephase, G2/M: doppelter Chromosomensatz und Mitose

Eine Anwendungsmöglichkeit des FACS ist die Messung des DNA-Gehaltes, die Rückschlüsse auf die Verteilung von Zellen in spezifischen Zellzyklusphasen zulässt. So durchlaufen undifferenzierte Zellen 4 Zellzyklusphasen (G1, S, G2 und M), die durch einen unterschiedlichen DNA-Gehalt gekennzeichnet sind. Somit können Zellen, wie in Abb. 2.5 angegeben, der G0/G1- (einfacher Chromosomensatz), der S- (Chromosomensatz wird gerade

verdoppelt) oder der G2/M-Phase (doppelter Chromosomensatz) zugeordnet werden. Zellen mit niedrigerem DNA-Gehalt (subG1-Peak) weisen fragmentierte DNA auf, unterliegen also einem apoptotischen Untergang. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert mit der DNA und ermöglicht damit die Erfassung der Zellzyklusphasen anhand der Fluoreszenzintensität der Einzelzellen. Da sich PI auch zwischen den RNA-Basen einlagert, muss für diese Analysen im Vorfeld eine RNase-Behandlung durchgeführt werden.
Nach der Vorbehandlung und Trypsinierung wurden für die Analyse $1x10^6$ der abgelösten As4.1 Zellen in PBS bei 1000U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml eiskalten 70 %igen Ethanol für 2h bei 4°C permeabilisiert. Nach Zusatz von 3ml kaltem PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert, die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert und mit 50µl einer RNase-Lösung (1 mg/ml) bei 37°C für 1h inkubiert, um die RNA zu eleminieren. Nach Entfernen der RNase-Lösung durch Zusatz von 3ml PBS gefolgt von einer Zentrifugation wurden die Zellpellets in 500µl PBS resuspendiert und mit 20µl einer 1mg/ml PI-Lösung für 10min inkubiert. Die Proben wurde anschließend in ein FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer im FL3-A Kanal gemessen (FACS-Calibur, Becton Dickinson (BD), USA). Der prozentuale Anteil der Zellen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt wurde mit Hilfe der Software Cellquest quantifiziert (BD, Heidelberg, Deutschland).

PI kann auch von Zellen aufgenommen werden, deren Membranintegrität beeinträchtigt ist. Auf diese Weise ist es möglich tote Zellen (frühe Nekrose und späte Apoptose) quantitativ zu erfassen. Dazu wurden $1x10^5$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert und die Pellets in 500µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach Zusatz von 5µl PI-Lösung (1mg/ml) und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben im FL2-Kanal (Emissionsspektrum 620nm) am FACS-Calibur gemessen und mit Hilfe der Software Cellquest ausgewertet.

Statistische Analyse

Alle Versuche mit mehr als zwei Vergleichsgruppen und $n \geq 6$ wurden in Anova I oder Anova II mit dem post-hoc Test nach Bonferroni untersucht (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Einzelne Versuche mit n=3 werden ohne statistischen Test als Trend angegeben.
Die Grafiken sind mit MEAN und SEM und teilweise der relativen Änderung und SEM gegenüber einer Kontrollgruppe dargestellt. Für die Analysen wurde Microsoft Excel (Redmont, USA) und GraphPad PRISM (Kalifornien, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung der Transkriptveränderung nach *Downregulation des (P)RRs*

Bei einer Transkriptomanalyse wird die Gesamtheit aller RNA-Moleküle einer Zelle (mRNA, rRNA, tRNA und nicht-kodierende RNA) zu einem gegebenen Zeitpunkt erfasst. Anders als das Genom, das statisch in einer Zelle vorgegeben ist, kann das Transkriptom variieren. Es kann sich z.B. nach Manipulation der Genexpression infolge einer siRNA-vermittelten *Downregulation* verändern, sodass aus diesen Veränderungen erste Indizien auf die Funktion des entsprechenden Proteins gezogen werden können.

Bei der Transkriptomanalyse von As4.1 Zellen zeigte sich nach *Downregulation* des (P)RRs u.a. eine starke Assoziation zu RNAs, die ziliäre bzw. Zellzyklus-relevante Proteine kodieren (s. Abb 1.4). Um diese Indizien zu validieren, wurden zunächst weitere RNA-Analysen mit Hilfe eines PCR-Arrays der Firma Qiagen durchgeführt, bei dem die Expression von 44 ausgewählten Transkripten zeitabhängig (12h bis 72h nach Transfektion) in *scramble* Kontroll- und (P)RR-*downregulierten* As4.1 Zellen untersucht wurde. Davon werden in dieser Arbeit die Daten der validierenden Haushaltsgene, sowie der relevant veränderten mRNAs vorgestellt.

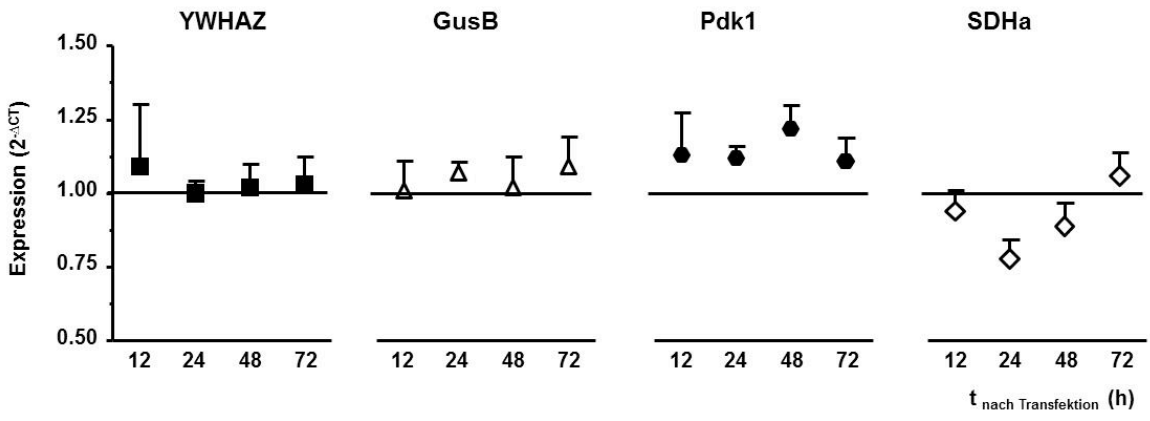


Abb. 3.1 Einfluss der (P)RR-*Downregulation* auf die Expression von Haushaltsgenen

Zeitlicher Verlauf der Expression der Haushaltsgene *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta* (YWHAZ), *β-Glucuronidase* (GusB), *Phosphoglyceratkinase 1* (Pgk1) *und Succinat Dehydrogenase Komplex Flavoprotein Subunit A* (SDHa) in siRNA-behandelten As4.1 Zellen normiert auf die *scramble* Kontrolle (Linie bei 1).
MW±SEM von 6 Versuchen. ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse: keine signifkanten Veränderungen.

Zuerst wurde der Expressionsverlauf von 4 Haushaltsgenen analysiert, da diese nachfolgend zur Normierung der anderen Transkripte eingesetzt und daher keiner Regulation durch die (P)RR-*Downregulation* unterliegen sollten. Unter Betrachtung der mRNA-Level der Haushaltsgene *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta* (YWHAZ), *β-Glucuronidase* (GusB), *Phosphoglyceratkinase 1* (Pgk1) und *Succinat Dehydrogenase Komplex Flavoprotein Subunit A* (Sdha) zeigte sich nur bei der Sdha-kodierenden mRNA ein geringgradiger Unterschied der Mittelwerte im Vergleich zwischen *scramble* Kontroll- und (P)RR-*downregulierten* As4.1 Zellen ($2^{-\Delta CT}$ Methode) (Abb. 3.1). Für die nachfolgenden Analysen wurde die Expression der Zieltranskripte sowohl auf die Expression der korrespondierenden *scramble* Kontrolle, als auch auf die des Haushaltsgenes YWHAZ normiert ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode).

Daraufhin wurde die siRNA-induzierte *Downregulation* der (P)RR-mRNA in dieser Versuchsserie überprüft. Wie in Abb. 3.2 dargestellt, war das (P)RR Transkriptlevel unter der siRNA-Behandlung zu allen Zeitpunkten signifikant reduziert, wobei das Maximum der *Downregulation* nach 24h erreicht wurde.

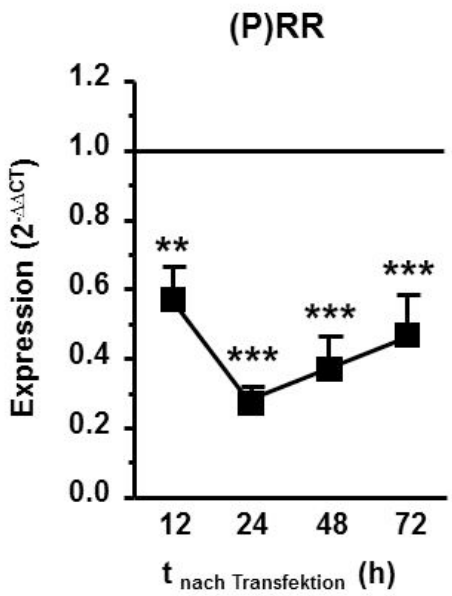


Abb. 3.2 (P)RR-*Downregulation* im Zeitverlauf

Zeitlicher Verlauf der (P)RR-mRNA Expression bei siRNA-behandelten As4.1 Zellen normiert auf die *scramble* Kontrollzellen. MW±SEM von 6 Versuchen. Scramble RNA vs. siRNA, ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit **p<0,01 und ***p<0,001, zeitlicher statistischer Vergleich nicht dargestellt.

Die nachfolgend im Zeitverlauf dargestellten Zieltranskripte umfassten 14 der 28 initial veränderten mRNAs der Transkriptomanalyse und wurden um weitere Zilien-assoziierte mRNAs ergänzt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Daten dann zu Subgruppen zusammengefasst, wobei im Folgenden nur die signifikant veränderten Transkripte grafisch dargestellt wurden.

Bei den Transkripten, welche dem Bardet-Biedl-Syndrom (Bbs) und dem Meckel-Grubel-Syndrom (Mks) zugeordnet sind, wurden die zeitlichen Verläufe von insgesamt 20 mRNAs beobachtet (Abb. 3.3 und 3.4). Unter (P)RR *Downregulation* wurde bei 7 der 16 untersuchten Bbs-mRNAs (Bbs1, Bbs3/Arl6, Bbs6/Mkks, Bbs7, Bbs8/Ttc8, Bbs14/Mks4/Cep290 und Bbs17) eine Hochregulation nachgewiesen. Hierbei zeichnete sich ein zeitliches Fenster ab; bei den meisten Transkripten kam es einen Tag nach anti-(P)RR siRNA-Behandlung zur signifikanten Erhöhung, welche in der Folge (48h und 72h nach Transfektion) wieder abklang. Einzig bei Bbs10 war die Transkriptmenge unter (P)RR *Downregulation* signifikant vermindert (insb. 12h und 24h nach Transfektion). Bei den weiteren analysierten Bbs-mRNAs (Bbs2, Bbs4, Bbs5, Bbs9, Bbs11, Bbs12, Bbs13, Bbs15) waren keine signifikanten Veränderungen nachweisbar.

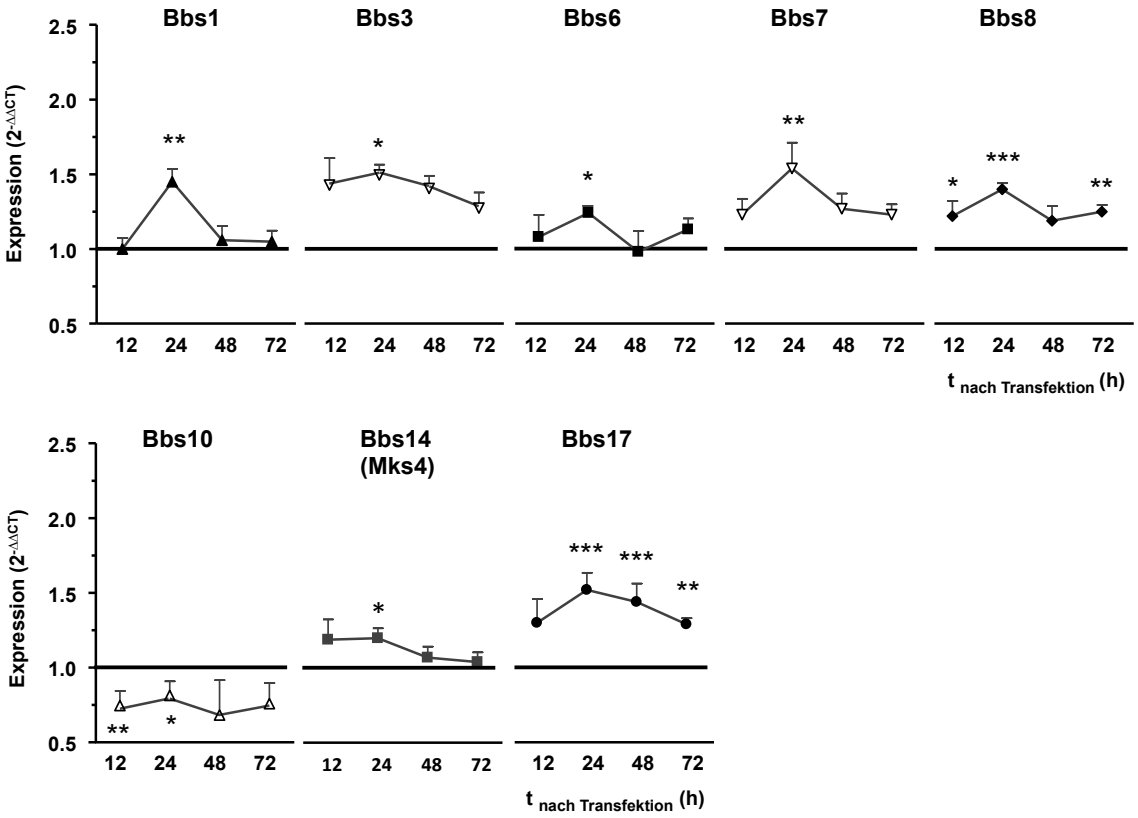


Abb 3.3 Bbs- assoziierte Transkripte im Zeitverlauf nach (P)RR *Downregulation*

Einfluss der (P)RR-*Downregulation* bei As4.1 Zellen auf die Expression von Bardet-Biedl-Syndrom-assoziierten Transkripten (Bbs) im Zeitverlauf normiert auf die *scramble* Kontrolle. Die zuvor auffällig erhöhten Transkriptmengen der Transkriptomanalyse von Bbs1, Bbs3 und Bbs7 wurden bestätigt. Zudem wurde der Array um die weiteren bekannten Bbs-Transkripte (Stand 2014: Bbs1-17) ergänzt. Hier sind lediglich die signifikant veränderten Transkripte dargestellt. MW±SEM von 6 Versuchen. *Scramble* RNA vs. siRNA, ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit *p<0,05 **p<0,01 und ***p<0,001, kein zeitlicher statistischer Vergleich durchgeführt.

Hinsichtlich der Mks-kodierenden mRNAs konnten die bei der Transkriptomanalyse erhobenen Befunde durch den Array bestätigt werden (Abb. **3.4**) Die *Downregulation* des (P)RRs führte zur Hochregulation der Transkripte Mks2/Tmem216, Mks5/Rpgrip1l, Mks8/Tctn2 und Mks11/Tmem231. Auch hier war die Hochregulation der Transkriptmengen ausschließlich 24h nach Transfektion nachweisbar.

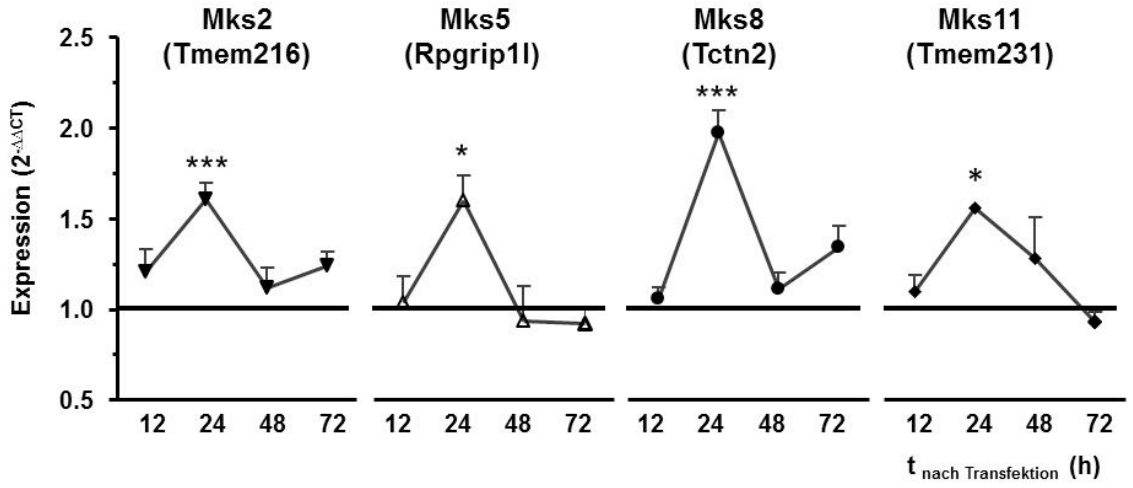


Abb. 3.4 Mks-assoziierte Transkripte im Zeitverlauf nach (P)RR *Downregulation*

Einfluss der (P)RR-*Downregulation* bei As4.1 Zellen auf die Expression von Meckel-Gruber-Syndrom-assoziierten Transkripten (Mks) im Zeitverlauf. Der Array bestätigt die Ergebnisse der Transkriptomanalyse. Darstellung normiert auf die *scramble* Kontrolle. MW±SEM von 6 Versuchen. *Scramble* RNA vs. siRNA, ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit *p<0,05 **p<0,01 und ***p<0,001, kein zeitlicher statistischer Vergleich durchgeführt.

Neben den Bbs- und Mks-assoziierten Transkripten waren in der Transkriptomanalyse auch mRNAs signifikant erhöht, deren Proteine für den intraflagellären Transport (IFT) essentiell sind. Hierzu gehörten IFT56/Ttc26, IFT22/Rabl5 und *Cilia and Flagella Associated Protein* 67 (CFAP)/Nme7. Auch die Expression dieser 3 mRNAs wurde im Array erneut gezielt untersucht. Analog zu den bereits dargestellten Daten ergab sich das gleiche Bild (Abb 3.5). Die Expressionswerte der Transkriptomanalyse bestätigten sich im Array und die Hochregulation war wiederum ausschließlich 24h nach Transfektion nachweisbar.

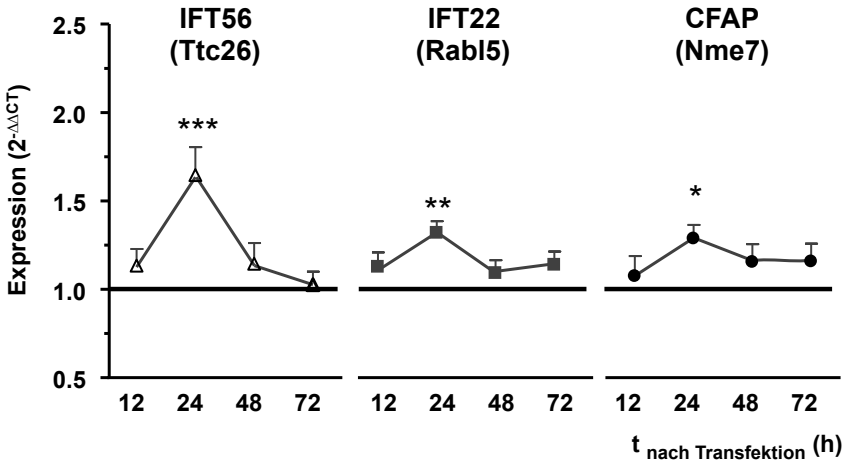


Abb. 3.5 IFT-assoziierte Transkripte im Zeitverlauf nach (P)RR *Downregulation*

Einfluss der (P)RR-*Downregulation* in As4.1 Zellen auf die zeitabhängige Expression von Transkripten, die mit dem intraflagellären Transport (IFT) assoziiert sind. Darstellung normiert auf die *scramble* Kontrolle. MW±SEM von 6 Versuchen. *Scramble* RNA vs. siRNA, ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit *p<0,05 **p<0,01 und ***p<0,001, kein zeitlicher statistischer Vergleich durchgeführt.

Da unter (P)RR *Downregulation* mehrere Transkripte zweier Ziliopathien, sowie des intraflagellären Transportes vermindert waren, legten diese PCR-Daten einen Zusammenhang zur ziliären Funktion nahe. Daher wurde durch Anfärbung mit dem anti-acetylierten α-Tubulin Antikörper überprüft ob die Expression, insb. des primären Ziliums, verändert wurde (Abb 3.6). Hierbei zeigte sich eine relevante Erhöhung zilientragender Zellen einen Tag nach (P)RR-*Downregulation*. Die gemessenen Längen der Zilien unterschieden sich nicht (*Scramble*: 2,84±0,94µm; (P)RR *Downregulation* 2,81±1,03µm), multi-ziliierte Zellen traten nicht auf.

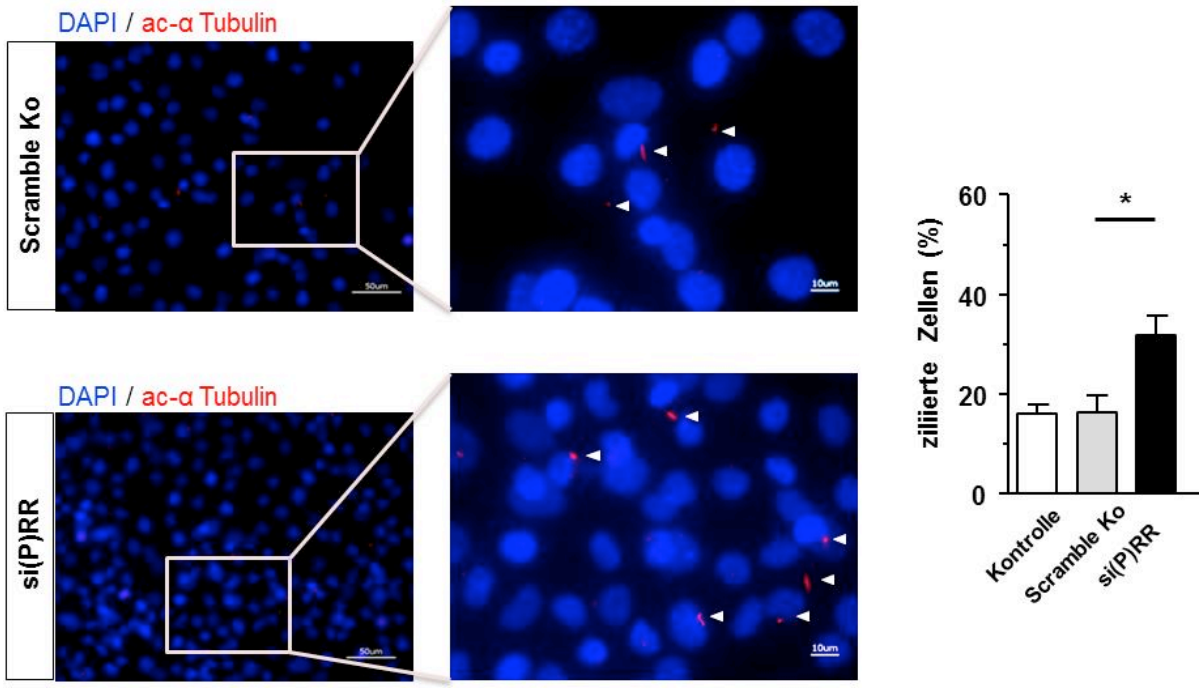
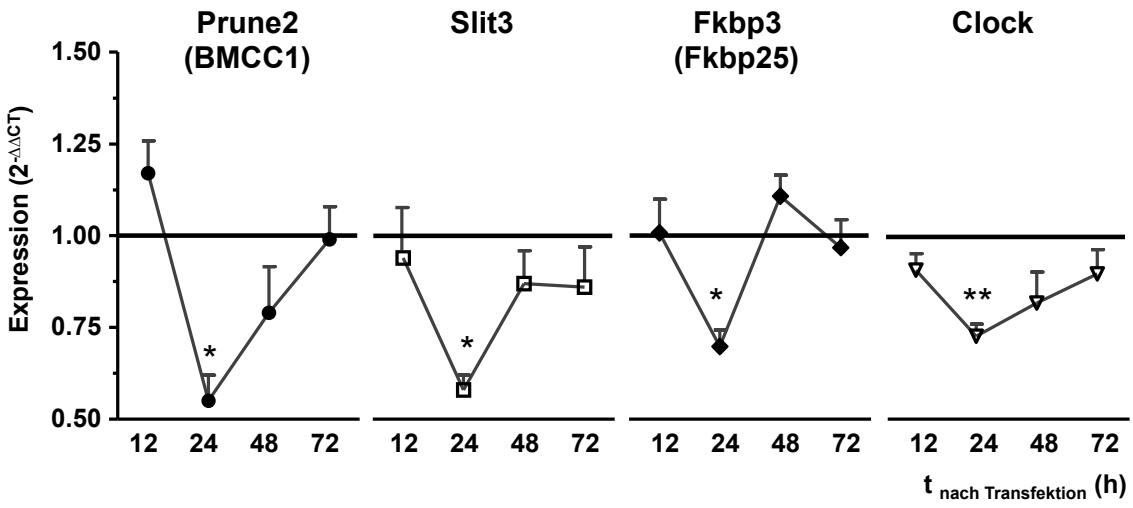


Abb. 3.6 Effekt der (P)RR-*Downregulation* auf die Anzahl ziliierter As4.1 Zellen

Dargestellt sind die exemplarischen und statistischen fluoroskopischen Ergebnisse der zilientragenden Zellen, wobei unter (P)RR *Downregulation* deutlich mehr Zilien gezählt wurden. MW±SEM von 6 Versuchen. *Scramble* RNA vs. siRNA, ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit *p<0,05 **p<0,01 und ***p<0,001, kein zeitlicher statistischer Vergleich durchgeführt.

Nachdem unter (P)RR *Downregulation* vermehrt Zilien exprimiert wurden, das primäre Zilium zellzyklusabhängig exprimiert wird und der ziliäre Basalkörper nur als mitotisches Zentrosom fungieren kann, wenn das primäre Zilium nicht ausgebildet ist, wäre eine simlutan veringerte Proliferationsrate und eine Verschiebung der Zellzyklusphasen zu erwarten.

Wie sich bereits in der Transkriptomanalyse (Abb 1.4) andeutete, fällt auf, dass es bei den (P)RR-*downregulierten* As4.1 Zellen tatsächlich zur signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von *prune homolg 2 with BCH domain* (Prune2) / BMCC1, *SLIT guidance ligand* 3 (Slit3), *FK506 binding protein* 3 (Fkbp3) / Fkbp25 und *circadian locomotor output cycles kaput* (Clock) kam (Abb 3.7). Deren Genprodukte werden allesamt dem Zellzyklus und dessen Regulierung zugeordnet. Auch hier war die *Downregulation* der genannten Transkripte auf das Zeitfenster von 24h nach Transfektion beschränkt.
Ein anderes Profil zeigte sich beim Pierce1/RbEST47 Transkript. Hier war die (P)RR-*Downregulation* mit einer markanten Erhöhung der Pierce1 Expression in einem Zeitraum von 24 bis 72h assoziiert.



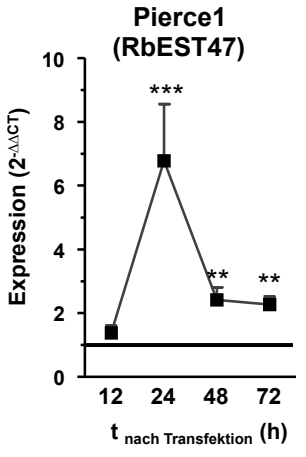


Abb 3.7 Zellzyklusassoziierte Transkripte unter (P)RR *Downregulation* im Zeitverlauf

Die Veränderungen der Transkriptomanalyse wurden bei den dargestellten 5 Transkripten bestätigt. Die weiteren mRNA Analysen waren im Array nicht signifikant verändert (Ube2v2, Acsl4 Lrrrc8b, Fibin, vgl. Abb 1.4) Darstellung normiert auf die *scramble* Kontrolle. MW±SEM von 6 Versuchen. *Scramble* RNA vs. siRNA, ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit *p<0,05 **p<0,01 und ***p<0,001, kein zeitlicher statistischer Vergleich durchgeführt.

Funktionell waren die (P)RR-*downregulierten* Zellen im Vergleich zur unbehandelten und *scramble* Kontrolle durch eine tendentielle Abnahme der Zellzahl (von 0,97±0,11x10^6 und 0,81±0,11 x10^6 auf 0,59±0,09 x10^6) eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate (von 0,52±0,06 und 0,43±0,05 auf 0,29±0,04), sowie eine signifikante Zunahme von Zellen in der G0/G1 Phase, bei gleichzeitiger Abnahme von Zellen in der G2/M-Phase charakterisiert (Abb. 3.8).

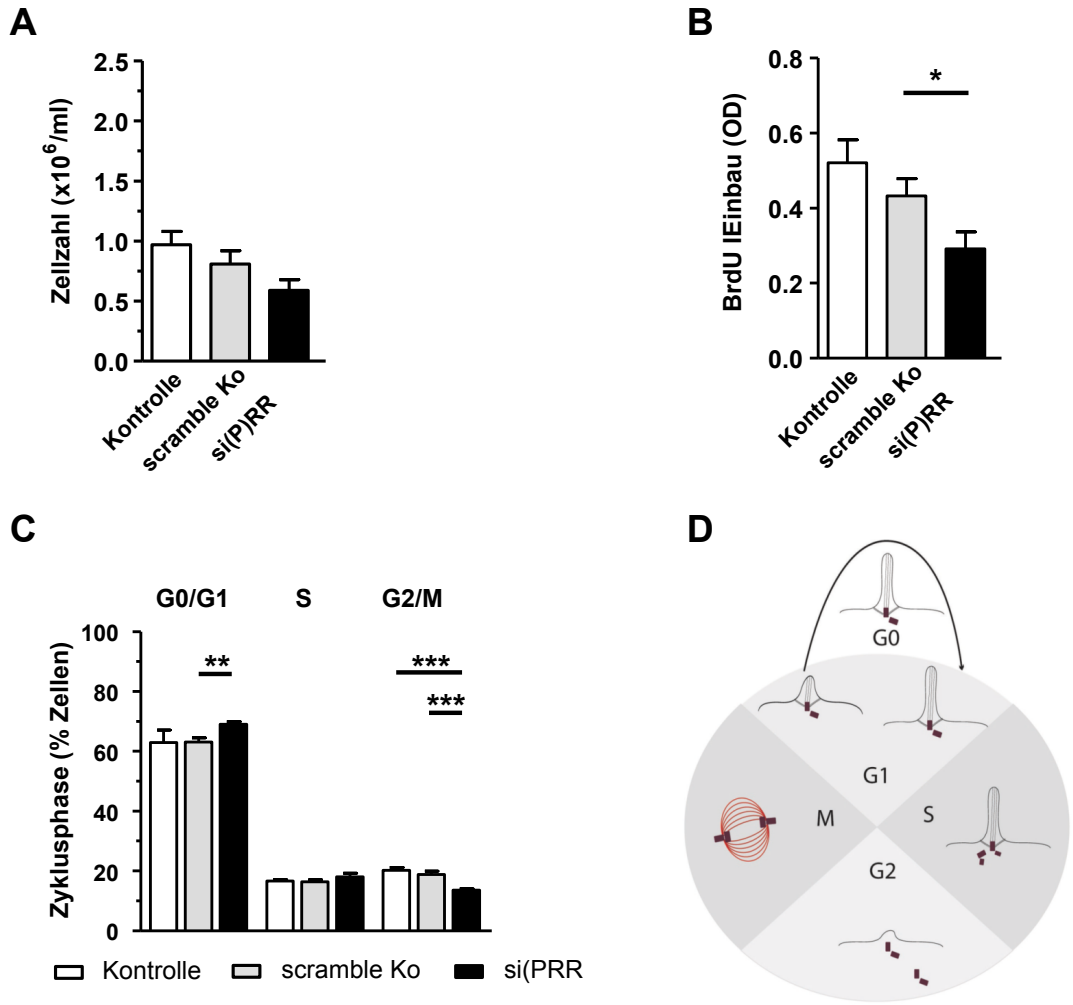


Abb. 3.8 Zellzahl, Proliferation, Zellzyklusanalyse 24h nach (P)RR *Downregulation*

Ohne Unterschied in der Zellzahl (A) wurde unter (P)RR *Downregulation* eine verminderte Proliferationsrate gegenüber der *Scramble* RNA Kontrolle gemessen (B). In den durchgeführten FACS Analysen zeigte sich unter (P)RR *Downregulation* eine relevante Kumulation in G0/G1 Phase bei gleichzeitiger Verminderunng des Zellanteils in der G2/M Phase (C). In Zusammenschau mit der zyklusabhängigen Expression des primären Ziliums (D) während der G1/G0 Phase ist dies kongruent mit den zuvor dargestellten erhöhten Zilienzahl der As4.1 Zellen. MW±SEM von 6 Versuchen. ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit*p<0,05; **p<0,01 und ***p<0,001

3.2. Effekte der (P)RR *Downregulation* auf Wnt-Zielgene

Wie einleitend dargestellt, hängen erstens (P)RR/V-ATPase und die Wnt-Signalwege im Signalosom und zweitens insbesondere Wnt-PCP Proteine mit dem primären Zilium zusammen. Hieraus ergab sich die Frage, ob der Einfluss der (P)RR *Downregulation* auf die Wnt-Signalwege durch PCR-Analysen nachgewiesen werden konnte.

Als Komponenten der Wnt/ß-Catenin Signalkaskade wurden im Rahmen dieser Arbeit die Transkriptlevel von *Axin 2 / Conductin*, *Engrailed 2* (En2), GSK-3ß, *Cyclin D1* und *Cyclin E1* untersucht (Abb. 3.9). Representativ für den Wnt-PCP wurde die Expression der Korezeptor *Flamingo*, das Kernprotein *Inturned* und die der Effektoren *Fuzzy* und *Vangl 2* analysiert (Abb. 3.10). Durch die RNA-Interferenzmethode wurde auch in dieser Versuchsserie die (P)RR-mRNA effizient (von 2,80±0,14 $x10^{-3}$ auf 0,93±0,06 $x10^{-3}$) reduziert (Abb. 3.9). Im Vergleich zur *scramble* Kontrolle war die (P)RR-*Downregulation* mit der signifikanten Erhöhung der Expression von *Engrailed 2* (von 1,32±0,10 $x10^{-5}$ auf 3,05±0,06 $x10^{-5}$) assoziiert. Daneben waren auch die Cyclin D1 (1,19±0,07 $x10^{-3}$ vs. 5,17±0,37 $x10^{-3}$) und Cyclin E1 mRNA-Spiegel (2,47±0,19 $x10^{-2}$ vs. 3,95±0,13 $x10^{-2}$) signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu blieben die mRNAs von Axin 2 / Conduktin und GSK-3ß durch die (P)RR-*Downregulation* unbeeinflusst.

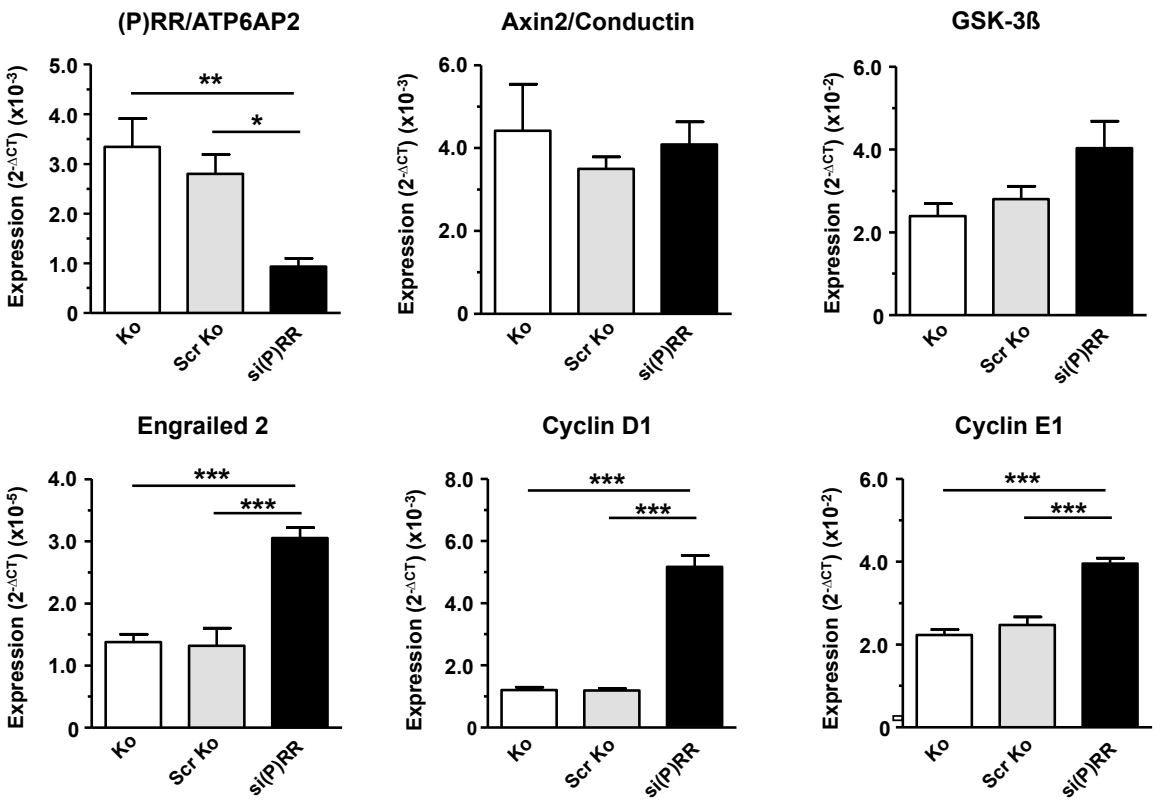


Abb. 3.9 Wnt/ß-*Catenin* mRNAs nach (P)RR-*Downregulation*

Einfluss der 24-stündigen *Downregulation* des (P)RRs bei As4.1 Zellen auf die Expression von Wnt/ß-*Catenin* Transkripten. Hierunter zeigten sich unveränderte mRNA Mengen des vermittelnden *Axin 2*, des *ß-Catenin* abbauenden *GSK-3ß*, sowie eine deutliche Erhöhung des Transkriptionsfaktor assoziierten *Engrailed 2*, als auch der zyklusregulierenden *Cycline D1* und *E1*. Darstellung normiert auf *YWHAZ*. MW±SEM von 8 Versuchen. ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit*p<0,05; **p<0,01 und ***p<0,001

Nicht nur die mRNA-Expression der Wnt/ß-*Catenin* Signalkaskade, sondern auch die des Wnt/PCP *Pathways* wurde durch die (P)RR-*Downregulation* beeinflusst. So kam es bei Korezeptor *Flamingo* und Effektor *Inturned* zur signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von 1,98±0,15 $x10^{-4}$ auf 4,05±0,20 $x10^{-4}$ und von 2,37±0,11 $x10^{-2}$ auf 6,43±0,51 $x10^{-2}$. Die Expression von Effektor *Fuzzy* (2,70±0,14 $x10^{-4}$ vs. 5,28±0,48 $x10^{-4}$) und Kernprotein *Vangl 2* (1,47±0,09 $x10^{-3}$ vs. 2,07±0,09 $x10^{-3}$) blieben unbeeinflusst.

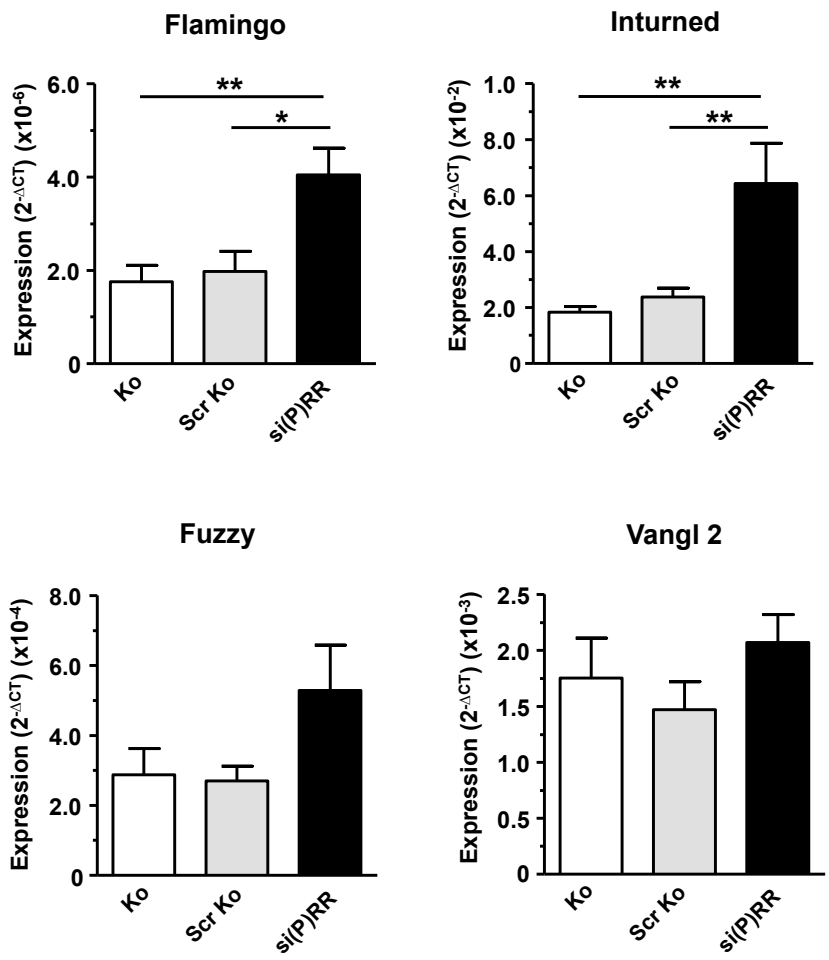


Abb. 3.10 Wnt/PCP mRNAs nach (P)RR-*Downregulation*

Einfluss der 24 stündigen *Downregulation* des (P)RRs in As4.1 Zellen auf die Expression von Wnt/PCP Transkripten normiert auf YWHAZ.
Flamingo ist ein Korezeptor, *Vangl 2* ein Kernprotein und *Inturned* / *Fuzzy* sind Effektoren des Wnt-PCP. MW±SEM von 8 Versuchen. ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit*p<0,05; **p<0,01 und ***p<0,001

3.3. Rolle der Zellkulturbedingungen für die Expression des (P)RRs

Da die (P)RR-*Downregulation* mit einer Modulation des Zellzyklus' (erhöhten Ziliogenese, Anreicherung von Zellen in G0/G1 Zellzyklusphase, Reduktion der Proliferation) und mit einem Einfluss von Wnt-*Pathways* assoziiert ist, stellte sich die Frage, ob andersherum die Kulturbedingungen die (P)RR-Expression verändern. Tatsächlich könnten in Reaktion auf die physiologischen Kulturbedingungen, wie z.B. der Zellkonfluenz oder der Zusammensetzung des Kulturmediums, die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen verschoben sein.

Basale (P)RR-Expression im Zeitverlauf

In der Regel nimmt mit fortschreitender Kulturdauer die Zellzahl pro Kavität exponentiell zu, bleibt dann durch eine Kontaktinhibierung konstant oder verringert sich wieder durch die Verschlechterung der Wachstumsbedingungen bzw. den Übergang in die pro-apoptotische G0-Phase des Zellzyklus'. Neben dem Nachweis der (P)RR-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene, lag der Fokus daher auf der Bestimmung der Zellzahl und der Proliferationsrate, sowie auf der Analyse metabolischer Parameter wie dem Glukose- und Laktatspiegel. Zusätzlich wurde hinterfragt, inwieweit die (P)RR-Expression durch die exogenen Wachstumsbedingungen d.h. einem täglichen Mediumwechsel gegenüber keinem Mediumwechsel im Verlauf einer 7-tägigen Kultur beeinflusst wird.

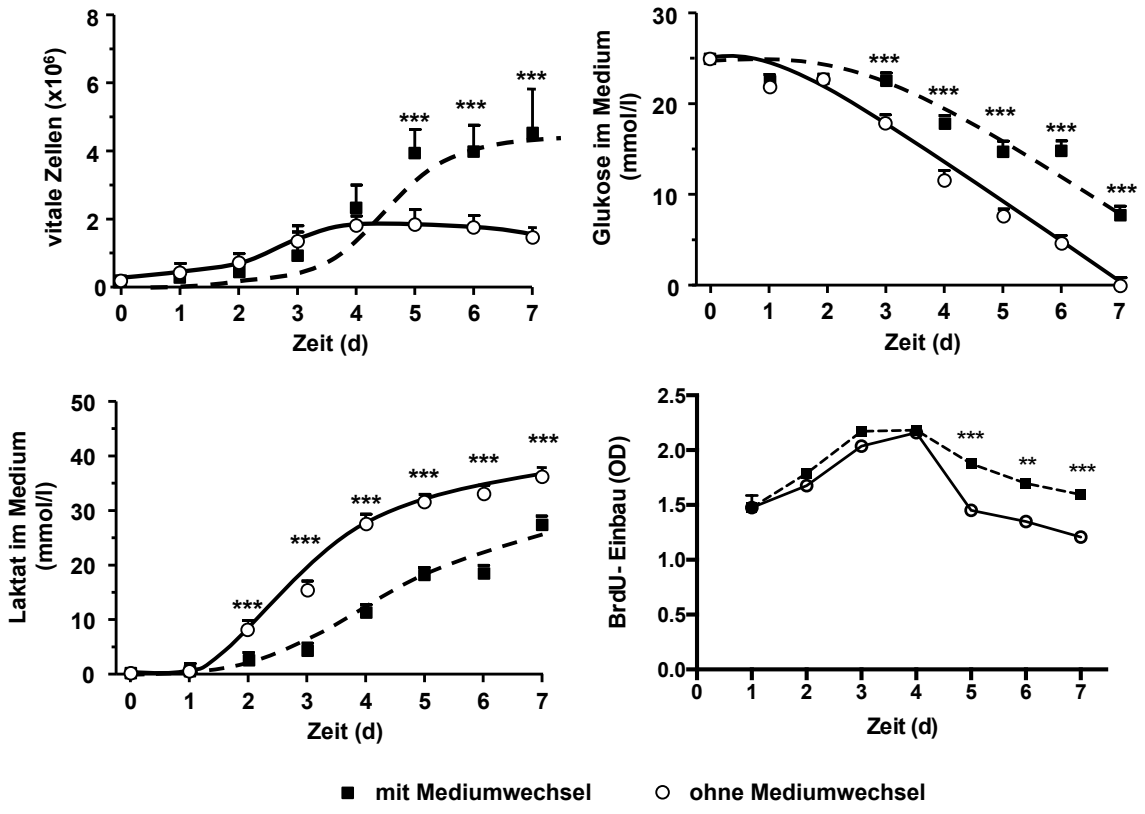


Abb 3.11 Zellzahl / Kulturbedingungen im Zeitverlauf in Abhängigkeit vom Medium

Die Zellzahl steigt schneller und die Proliferationsrate fällt später, wenn das Medium kontinuerlich gewechselt wird. MW±SEM von 6 Versuchen. Vergleich der Kulturmedien, ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit*p<0,05; **p<0,01 und ***p<0,001, zeitlicher statistischer Vergleich nicht dargestellt.

In den Ergebnissen fällt wie erwartet auf, dass bei den As4.1 Zellen ohne Mediumwechsel (oMW) die Anzahl vitaler Zellen signifikant geringer war als bei den As4.1 Zellen mit täglichem Mediumwechsel (mMW). Darüber hinaus waren die Zellen oMW erwartungsgemäß durch eine erhöhte Laktatakkumulation und einen stärkeren Glukoseabfall im Medium gekennzeichnet. Letztlich wird der gelungene Versuchsaufbau auch durch die signifikant verminderte Proliferationsrate (BrdU Einbau) oMW nachgewiesen (Tag 5 mMW: 1,877±0,097 oMW: 1,452±0,026, n=6, Abb 3.11). Hierunter sollten nun die Auswirkungen auf den (P)RR untersucht werden.

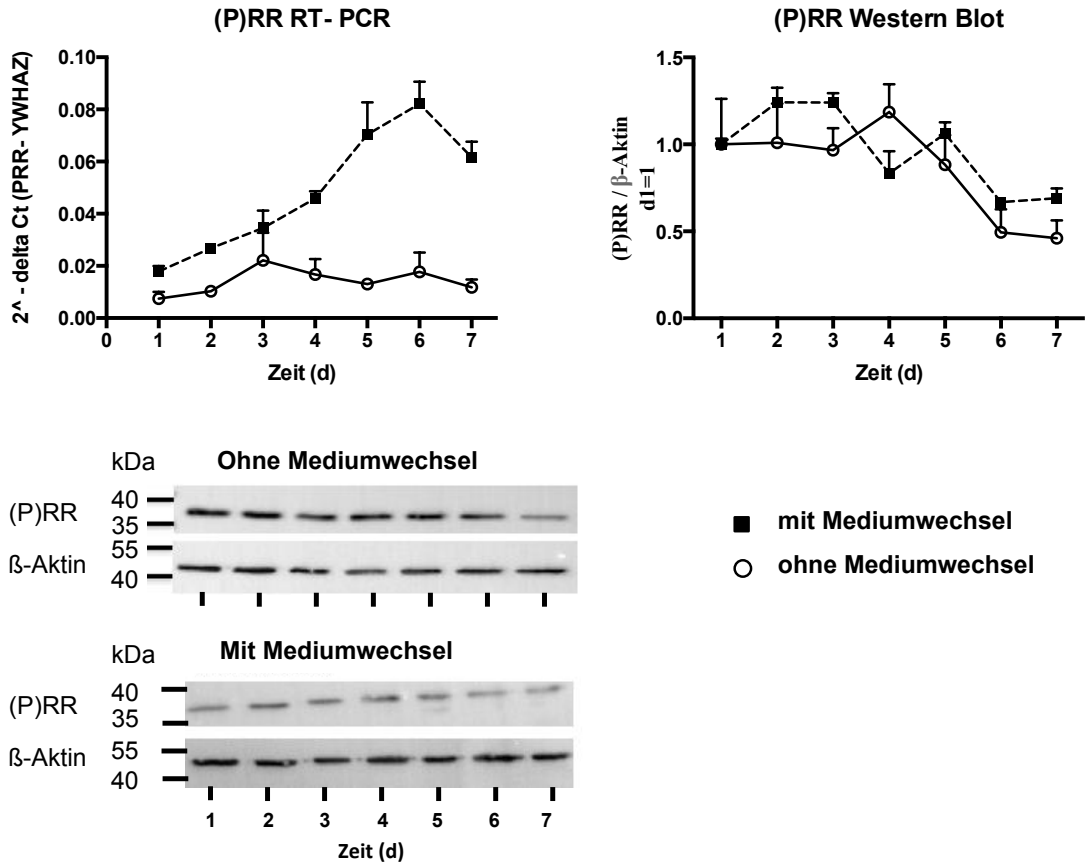


Abb. 3.12 (P)RR Mengen unter verschiedenen Kulturbedingungen in einer Woche

Chronologische Darstellung der mRNA Menge, der relativierten Proteinmenge (erster Tag =1,0) mit exemplarischer Darstellung eines Blots im Zeitverlauf von einer Woche mit und ohne Mediumwechsel. Keine statistische Untersuchung bei n=3 Versuchen.

Ohne statistische Analyse bei niedriger Versuchszahl zeigte sich in der RT-PCR eine tendentiell erhöhte (P)RR Transkriptmenge unter täglichem Mediumwechsel, während die relative (P)RR mRNA Menge ohne Mediumwechsel weitestgehend stabil blieb.

Diese Tendenz konnte auf Protein-Ebene durch die Western-Blot Analysen nicht bestätigt werden. Dargestellt ist hier neben der (P)RR-Protein Quantifizierung ein exemplarisches Bild eines Western Blots. Anhand des exemplarischen Bildes wird ersichtlich, dass deutliche Inter-Assay-Variabilitäten (Modulation der Inkubationszeiten bei der Immunreaktion, Frische des Antikörpers) zu beobachten sind (Abb. 3.12). Daher wurde bei der Darstellung der (P)RR-Expression nicht nur auf die Beladungskontrolle ß-Aktin sondern auch auf den Tag 1 normiert, der für beide Kulturbedingungen identisch ist. Hiernach zeigte sich unabhängig vom Mediumwechsel eine tendenzielle Abnahme der (P)RR-Expression mir fortschreitender Kul-

turdauer. Die stark wechselnden Proteinmengen von Tag 3 bis 5, sind hierbei eher eine methodische Verzerrung bei n=3 Versuchen, als eine zugrundeliegende zelluläre Regulation des (P)RR.

Wegen der notwendigen Normierung auf Tag 1 und ohne eindeutige Tendenz von RT-PCR und Western-Blot erschien eine Erweiterung der Versuchsreihe nicht sinnvoll, gleichzeitig ist eine belastbare statistische Untersuchung nicht durchführbar und die Datenlage für eine Aussage zum Verhalten des (P)RR mit/ohne Mediumwechsel zu vage.

Zellzyklusmodulation durch Serumvariation

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Entzug des nährstoffreichen fetalen Kälberserums mit einer Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase assoziiert ist. Nachfolgend kann der Arrest durch Supplementierung des Serums wieder aufgehoben werden, sodass es je nach Zeitdauer zur Synchronisierung der Zellen in einer spezifischen Zellzyklusphase kommt.

Da sich in Vorversuchen zeigte, dass ein vollständiger 48-stündiger Serum-Entzug zu einer erhöhten Absterberate der As4.1 Zellen führte, wurde auf einen kompletten Entzug des Serums verzichtet. Stattdessen wurde das zugesetzte fetale Kälberserum (FKS) von 10 % auf 0,5 % reduziert. In dieser Versuchsserie wurden die As4.1 Zellen drei verschiedenen Versuchsbedingungen für 48h ausgesetzt:

Kontrolle: Medium mit 10 %iger FKS-Supplementierung
Arrest: Medium mit 0,5 %iger FKS-Supplementierung
Restimulation: 24 h mit 0,5 % FKS- und 24 h mit 10%igem FKS-Supplementierung

Die FKS-Reduktion führte wie erhofft zu einem signifikanten Abfall der Proliferationsrate von 1,01±0,05 auf 0,69±0,04 (Abb. 3.13 C). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe waren unter Minimalserum allerdings keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahl, der Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase und der Anzahl ziliierter Zellen nachweisbar.

Nach Restimulation steig die Zellzahl wie erwartet gegenüber der arretierten Zellen (von 1,88±0,10 $x10^6$ auf 2,92±0,20 $x10^6$) an. Des Weiteren konnte der gewünschte Effekt durch die Proliferationsrate gegenüber den arretierten Zellen belegt werden (Arrest: 0,69±0,04, Restimulation: 0,97±0,06). In der Zellzyklusanalyse war unter Restimulation die Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase reduziert, während die der Zellen in der S-Phase anstieg. Wie erwartet sank die zyklusabhängige Expression der Zilien hierunter tendentiell ab (Abb 3.14).

Diese Veränderungen waren mit einer Modulation der (P)RR-Expression assoziiert, allerdings beschränkte sich diese auf die mRNA-Ebene (Abb. 3.15). So zeigte sich nach FKS-Reduktion eine Steigerung des (P)RR-Transkriptgehaltes von 5,1±0,3 $x10^{-2}$ auf 6,5±0,4 $x10^{-2}$ und nach Restimulation eine signifikante Reduktion auf 4,2±0,5 $x10^{-2}$. Die Proteinmenge des (P)RR war nicht relevant verändert (Abb 3.15).

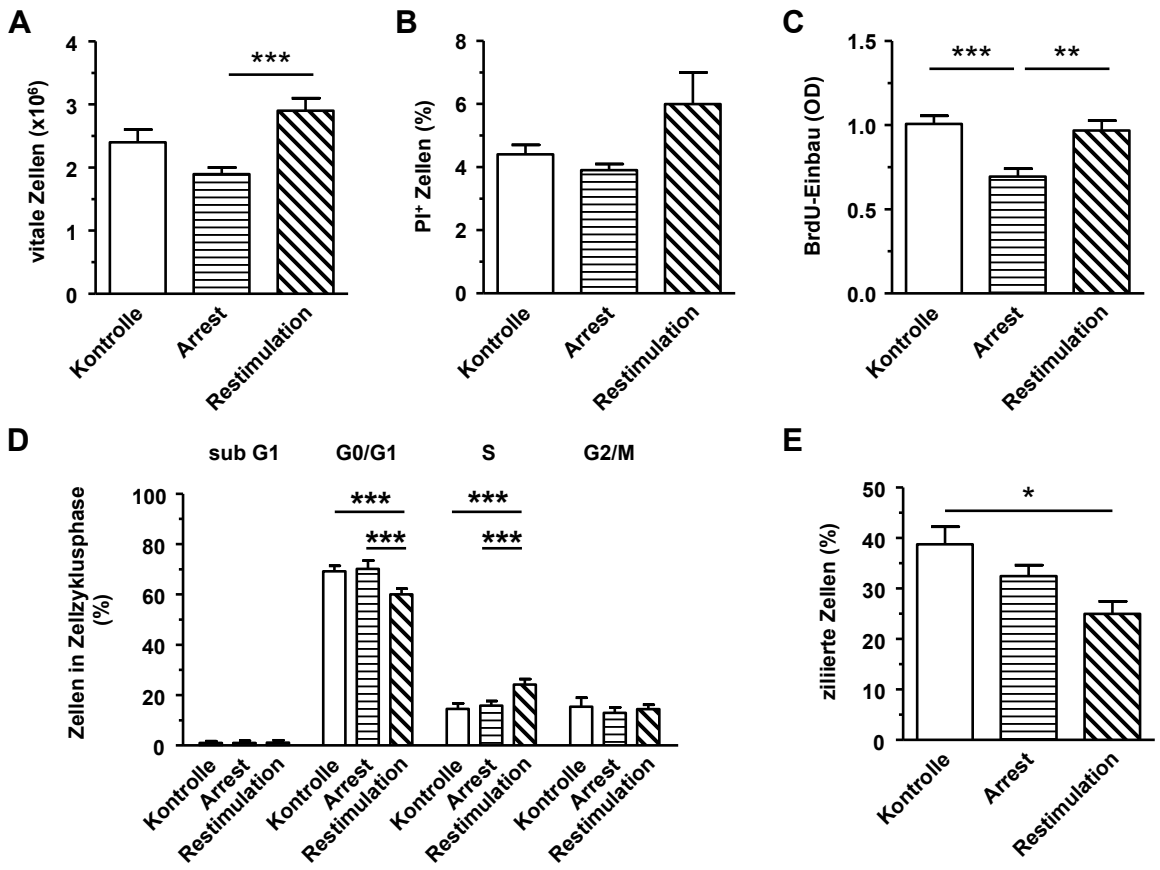


Abb 3.14 Effekte der Mediumvariation über 48h auf As4.1 Zellen

Unter Minimalserum war die Proliferationsrate signifikant vermindert, was sich in der Anzahl vitaler Zellen zwischen Arrest- und Restimulationsgruppe widerspiegelte. Zudem fand unter Restimulation eine Verschiebung aus der G0/G1 Phase in die S-Phase statt. Der Anteil der zilientrangenden Zellen war passend hierzu unter Restimulation vermindert. MW±SEM von ≥6 Versuchen. ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit*p<0,05; **p<0,01 und ***p<0,001

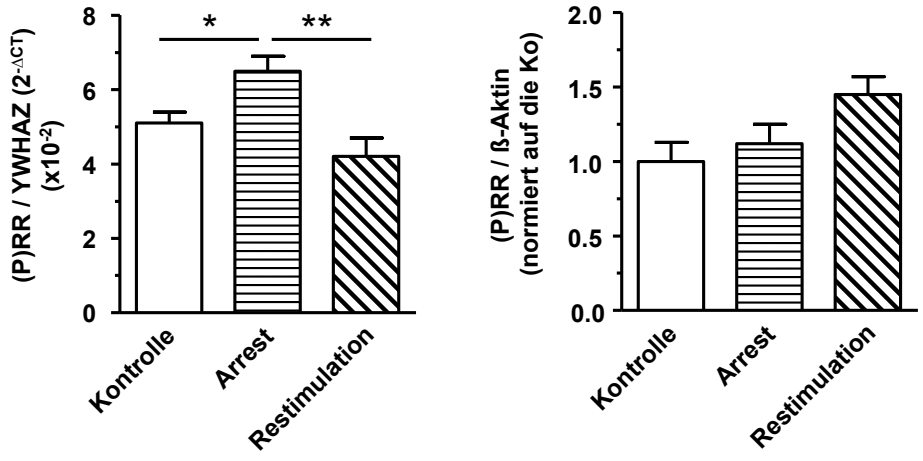


Abb 3.15 Effekte der Mediumvaration über 48h auf den (P)RR

Unter der Exposition verschiedener Mediumvarianten war die mRNA Expression im Zyklusarrest erhöht. Dieses Ergebnis wurde jedoch auf Proteinebene nicht bestätigt. Westernblot Darstellung auf die Kontrolle (Ko) normiert. MW±SEM von ≥ 6 Versuchen. ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit*p<0,05 **p<0,01 und ***p<0,001

Einfluss der extrazellulären Laktatkonzentration auf die (P)RR-Expression

Unter anaeroben aber auch unter aeroben Bedingungen wird durch die Zellen Laktat gebildet und ins Medium sezerniert. Dies führt zur Akkumulation des Laktats und trotz Abpufferung des Mediums zur Ansäuerung des pH-Wertes.

Bei den vorherigen Daten zum Zeitverlauf einer Woche (s. Abb 3.11) zeigte sich, dass mit steigender Zellzahl pro Kavität bis zu 30 mmol/l Laktat sezerniert werden. Dies wurde als Anhaltspunkt genommen, um im nachfolgenden Versuchsdesign den Einfluss der Laktatkonzentration und damit des pH-Wertes auf die (P)RR-Expression zu untersuchen.

Hierzu wurden As4.1 Zellen über 24h und 48h mit Laktatkonzentrationen von 5-30mmol/l inkubiert. Aus Abb. 3.16 wird ersichtlich, dass die exogene Laktatzugabe wie erwartet mit der Reduktion des pH-Wertes korrelierte. Durch die relevante Reduktion der Proliferationsrate (BrdU Einbau) nach 24h und 48h konnte der gewünschte Laktat-induzierte Effekt auf die As4.1 Zellen nachgewiesen werden. Allerdings geht mit erhöhter Laktatexpostition, insbesondere mit 30mmol/l, eine Reduktion der Zellvitalität (von ~98 % auf ~91%) einher.

Die Analysen zur (P)RR-Expression ergaben eine tendendielle Annähreung der mRNA (P)RR Mengen, bei gleichzeitig divergierender Tendenz der Proteinmengen. Wegen dieses inhomogenen Bildes wäre eine einzelne Signifikanz in Kombination mit der geringen Versuchsanzahl nicht ausreichend um eine belastbare Interpretation der (P)RR Reaktion abzuleiten. Daher wurde auf eine statistische Untersuchung verzichtet.

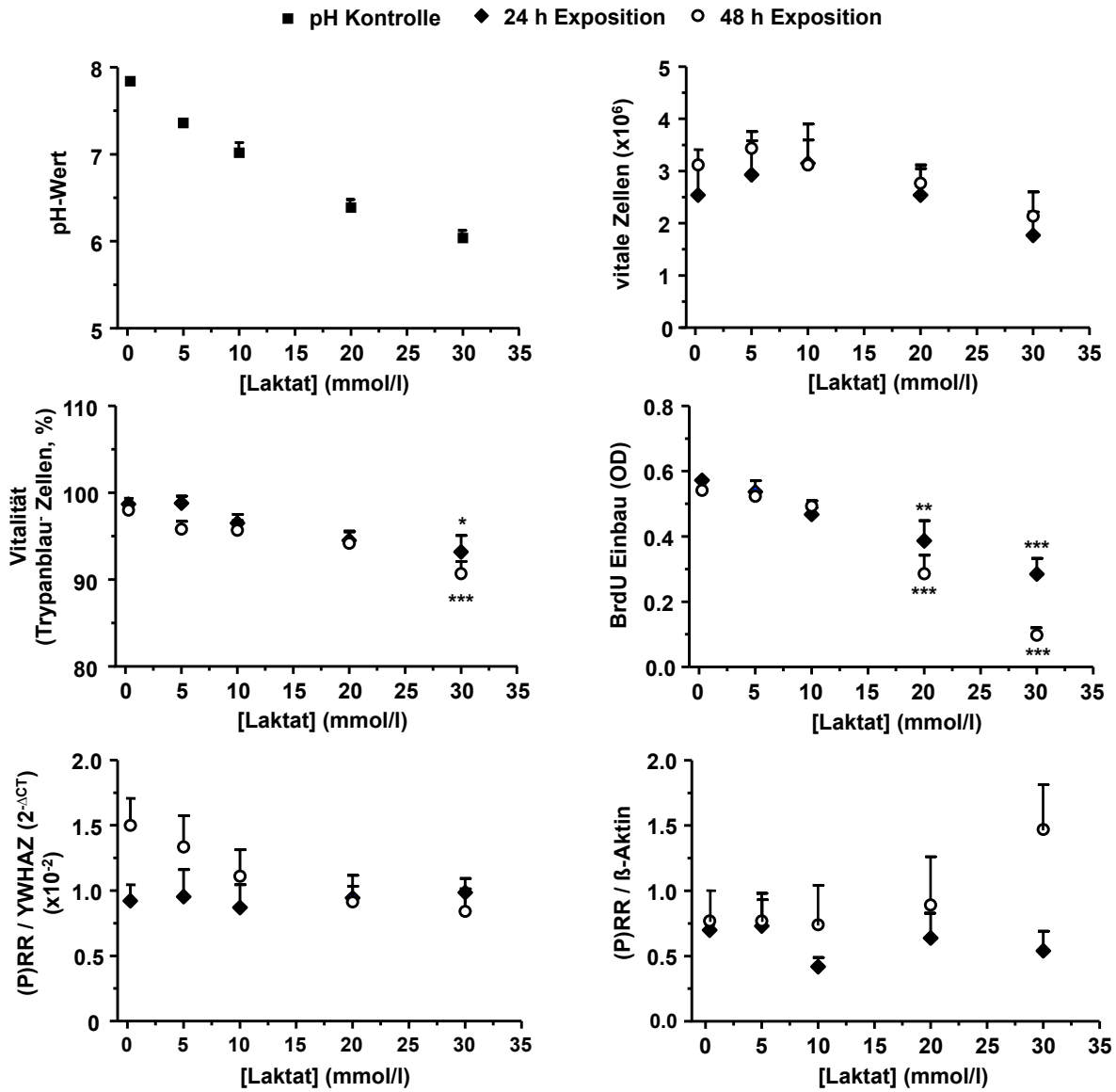


Abb 3.16 Darstellung der Ergebnisse unter Laktatexposition nach 24h und 48h

Ergebnisse der Laktatexposition über 24h und 48h in aufsteigenden Konzentrationen. Hierbei zeigt sich eine weitestgehend stabile Zellzahl und Vitalität. Die Proliferationsrate (BrdU Einbau) wurde durch erhöhte Konzentrationen gebremst.
Zellzahl, pH-Wert, Vitalität MW±SEM von 6 Versuchen. Laktatabhängige Veränderung: ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse mit*p<0,05 **p<0,01 und ***p<0,001. Kein Gruppenvergleich von 24h vs. 48h durchgeführt.
Die (P)RR Mengen (insb. nach 48h) sind auf mRNA und Proteinebene tendentiell gegenläufig. RT-PCR und Westernblot MW±SEM von 3 Versuchen, kein statistischer Test.

4. Diskussion

4.1. Assoziation zwischen (P)RR-*Downregulation* und primärem Zilium

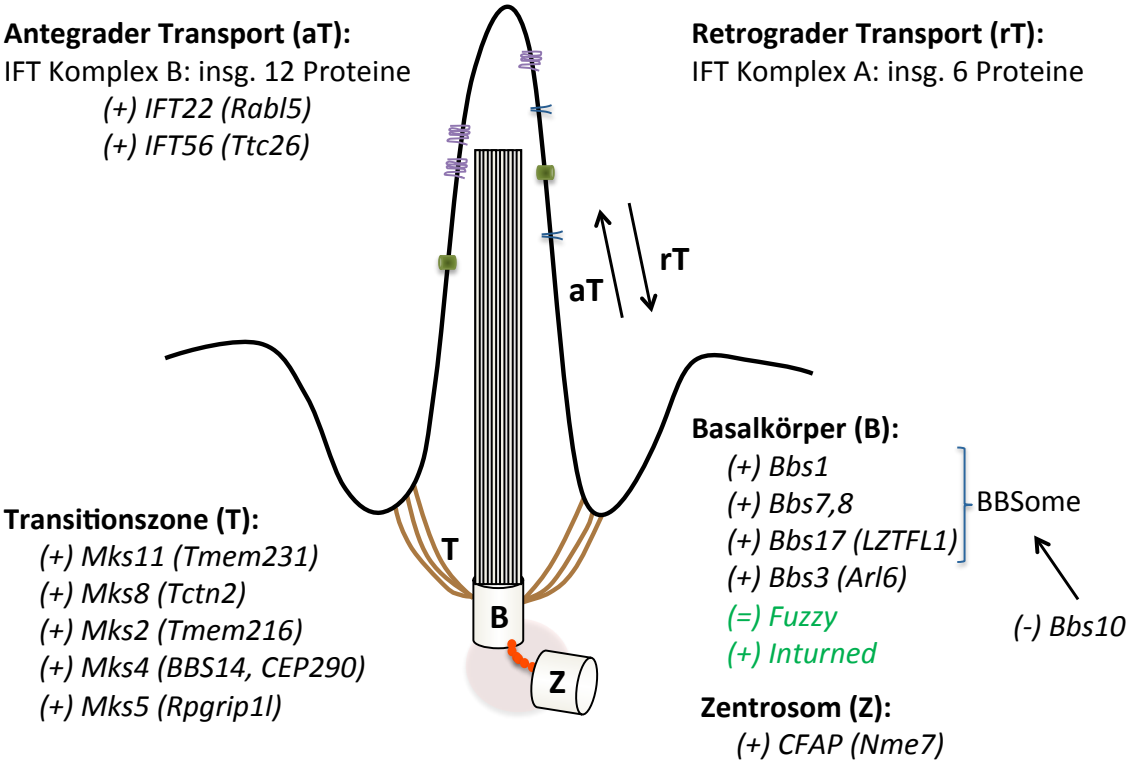


Abb 4.1
Funktionelle und räumliche Aufteilung der Transkripte nach (P)RR *Downregulation*

Relevante Transkriptmengenänderungen (+/−/=) verschiedener funktionelle Gruppen einen Tag nach (P)RR *Downregulation* und ihre Relation zum Zilium. Mit Ausnahme von Bbs10 waren die veränderten Transkriptmengen erhöht und werden der ziliären Grundstruktur, dessen Aufbau oder dem intraflagellären Transport zugeordnet (adaptiert nach Forsythe and Beales 2013, Nakayama and Katoh 2018, Wang and Dynlacht 2018).

Als membranöse Ausstülpung der Zellmembran mit innenliegendem Grundgerüst (Axonem) und Separation (Transitionszone) zur übrigen Zelle sitzt das primäre Zilium dem Basalkörper in der G0/G1 Phase auf und wird während der G2 Phase abgebaut. Der Auf-und Abbau des Ziliums wird durch den intraziliären Transport gewährleistet (Plotnikova, Pugacheva et al. 2009). Unter (P)RR *Downregulation* war die Proliferationsrate (BrdU Einbau, Abb. 3.8) in As4.1 Zellen reduziert und der Anteil Zilien tragender Zellen erhöht (Fluoreszenzmikroskopie Abb 3.6). Die Zellzyklusanalyse der (P)RR depletierten Zellen zeigte einen unveränderten Anteil in der S-Phase, jedoch eine Steigerung in der zilienaufbauenden G0/G1 und eine Verminderung in der zilienabbauenden G2/M-Phase (Abb. 3.8). Insgesamt spricht dies für einen, durch die (P)RR *Downregulation*, ausgelösten Zellyzklusarrest in der zilientragenden Phase,

weshalb die nachgewiesene Verminderung der Zyklus-assoziierten und die Erhöhung der Zilien-assoziierten Transkripte zu erwarten ist.

Obwohl verschiedene Genprodukte wegen des gemeinsamen syndromalen Phänotypen in ihrer Nomenklatur unter dem Bardet-Biedl- oder Meckel-Gruber-Syndrom (Bbs, Mks) zusammengefasst und chronologisch benannt werden (Forsythe and Beales 2013, Madhivanan and Aguilar 2014), sind deren Funktionen vielfältig.
Mit dem Namen des Meckel-Gruber-Syndroms werden vorrangig die Transkripte der ziliären Transitionszone assoziiert, welche das primäre Zilium von der übrigen Zelle trennt (Garcia-Gonzalo and Reiter 2017). So waren unter vermehrter Zilienexpression durch (P)RR *Downregulation* mehrere Transkripte der Transitionszone (Mks11/Tmem231, Mks8/Tctn2, Mks2/Tmem216, Mks5/Rpgrip1l, Bbs14/CEP290) überexprimiert. Wegen ähnlicher Phänotypen bei Tmem216 Ausfall und Wnt/PCP Fehlfunktion wird eine mögliche Ko-Rezeptorfunktion von Tmem216 im Wnt-PCP diskutiert (Valente, Logan et al. 2010).
Den Übergang des vesikulären Transportes zwischen Zelle und Zilium kontrolliert das BBSome (Jin and Nachury 2009), welches durch das Chaperon BBS6/Mkks aufgebaut (Seo, Baye et al. 2010) und durch Bbs1 und Bbs3/Arl6 in der Zellmembran verankert wird (Wiens, Tong et al. 2010, Mourao, Nager et al. 2014). Unabhängig von BBSome und Basalkörper ist CFAP67 / Nme7 keiner spezifischen Ziliopathie zugeordnet, wird aber im Bereich des Zilienaufbaus als ein Bestandteil des γ-Tubulin-Ringkomplexes (γTurC) beschrieben (Liu, Choi et al. 2014). Der hierdurch geformte Ring (Raynaud-Messina and Merdes 2007) wird in der Duplikation von Zentriolen diskutiert und ist für den mikrotubulären Aufbau notwendig (Schiebel 2000). Im Rahmen dieser Arbeit waren die Transkriptmengen der o.g. Bestandteile des ziliären Grundgerüstes und der ziliären Schranke unter (P)RR *Downregulation* relevant erhöht.
Nach dem kontrollierten Import in das Zilium wird der intraflagelläre Transport (IFT) durch Motorproteine wie Kinesin/Dynein, sowie durch die ante- und retrograd beweglichen Genprodukte von Bbs7 und Bbs8 (Blacque, Reardon et al. 2004) gewährleistet. Darüberhinaus wird auch Bbs17/LZTFL mit dem ziliären Transport assoziiert (Jiang, Promchan et al. 2016). Neben der relevanten Erhöhung von Bbs7, 6 und 17 bestätigte sich zudem eine Überexpression der antegraden, Zilium aufbauenden, IFT-B Komponenten IFT22/Rabl5 und IFT56/Ttc26 (Nakayama and Katoh 2018). Zwar führen Störungen im entgegengesetzten, Zilium abbauenden IFT-A Komplex durch einen eingeschränkten Transport von *β-Catenin* zu Einschränkungen des kanonischen Wnt (Balmer, Dussert et al. 2015, Vuong, Iomini et al. 2018), wes-

halb eine Verbindung zum (P)RR nicht unwahrscheinlich ist, jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit in der initalen Transkriptomanalyse keine relevante Veränderung IFT-A assoziierter Transkripte festgestellt. Um eine Veränderung des ziliären Rücktransport und Exportes unter (P)RR *Downregulation* sicher ausschließen zu können, werden jedoch weitere gezielte Untersuchungen benötigt.
Als einziges Transkript mit einer Verminderung unter (P)RR *Downregulation* ist Bbs10 nicht Teil des BBSome aufbauenden Chaperonkomplexes, sondern fördert dessen Zusammensetzung (Zhang, Yu et al. 2012). Im jetzigen Versuchsaufbau unter (P)RR Reduktion und überexprimiertem Zilium wäre eine Reduktion der Bbs10 Trankskriptmenge als eine frühe Reaktion bei bereits exprimiertem Zilium denkbar, wenngleich dies bei aktuellem Kentnissstand und ohne Proteinnachweis hypothetisch bleibt.

Insgesamt ist nach (P)RR *Downregulation* von einer vermehrten Expression des primären Ziliums auszugehen, weshalb eine Transportverschiebung zu Gunsten des importierenden, antegraden, zilienaufbauenden Transportes wahrscheinlich ist. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auf vielen Ebenen (Transitionszone, BBSome, IFT) unterstützt, jedoch durch eine alleinige Analyse der mRNA Daten nicht bewiesen werden.

4.2. Beeinflusst der Zellzyklus die (P)RR-Expression?

Durch die (P)RR *Downregulation* wurde in dieser Arbeit neben einer vermindertete Proliferationsrate (Abb 3.6) auch ein Zellzyklusarrest in G0/G1 Phase festgestellt. Hiermit gingen ein verminderter Anteils von Zellen in der G2/M Phase, bei gleichzeitig unverändertem Verhältnis in der S-Phase einher (Abb. 3.8). Durch die unilaterale Mengenminderung mehrerer Zyklus-assoziierter Transkripte (Abb. 1.4) und der pro-proliferativ wirkenden Wnt-Signalwege hatte sich eine Interaktion zwischen dem (P)RR und dem Zellzyklus angedeutet. In den gezielten Kontrollen der Transkriptmengen wurden die zuvor gemessenen Veränderungen im Zeitverlauf nach (P)RR *Downregulation* bestätigt (Abb. 3.7).
Bei genauerer Betrachtung der Funktionen ist eine verminderte Transkriptmenge von *Fkbp3*, welches in nicht-kleinzelligen Lungenkrebsarten pro-proliferativ wirkt (Zhu, Li et al. 2017), durch die verzögerte Proliferation zu erwarten, wohingegen die Reduktion der Tumorsuppresoren *Prune2* und *Slit3* (Salameh, Lee et al. 2015, Zhang, Guo et al. 2015) bei einem verstärkten Wachstum zu erwarten wäre. Auch durch die gewonnenen Daten auf mRNA Ebene bleibt

die Interaktion von *Slit3* und *β-Catenin* unklar, zumahl die bisher beschribenen Interaktionen von untersuchtem Gewebe und Zelltyp abhängig sind (diskutiert in Kim, Choi et al. 2018).
Des Weiteren deutet die relevante Verminderung von *Clock* auf einen möglichen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik hin. Im Wechselspiel von (P)RR und *Clock* könnte der gemeinsame Signalweg über die MAP-Kinasen (de Paula, Lamb et al. 2008, Goldsmith and Bell-Pedersen 2013) beteiligt sein, wobei auch die zirkadiane Größenveränderung der Tochterzentriolen (Aydogan, Wainman et al. 2018) und die zirkadiane Expression mehrerer Wnt-Bestandteile Fragen zur Relation mit dem (P)RR aufwerfen (Matsu-Ura, Moore et al. 2018).
Zuletzt bleibt offen wie der Anstieg von *Engrailed 2* und der *Cycline D1/ E1* (Abb 3.9), als nachgeschaltete pro-proliferative Effektoren des kanonischen Wnt, mit dem nachgewiesenen Zellzyklusarrest und der verminderten Proliferationsrate unter (P)RR *Downregulation* einhergehen.

Neben den Transkriptanalysen unter (P)RR *Downregulation* sollten extern veränderte Kulturbedingungen zu einer veränderten Proliferationsrate und/oder einem Zyklusarrest führen, wonach mögliche Auswirkungen auf den (P)RR untersucht wurden.
Hierzu zählte der ausgesetzten Mediumwechsel, wodurch notwendige Nährstoffe verbraucht wurden, während zelluläre Abbauprodukte kumulierten. Hierbei zeigte sich ab Tag fünf die erwartete verminderte Proliferationsrate im Vergleich der beiden Gruppen. Da die nachfolgende Quantifizierungen auf mRNA- und Proteinebene teils widersprüchliche Ergebnisse zeigen und die niedrige Anzahl der Versuchswiederholung kaum eine belastbare Statistik zulässt, kann die differiernde mRNA Menge unter verschiedenen Wechselfrequenzen des Mediums nur als Tendenz interpretiert werden (s. Abb 3.12).
Als weiteren externen Stimulus wurden die Zellen über einen unterschiedlichen Zeitraum mit Minimalserum kultiviert. In der Charakterisierung der Zellen spiegelte sich der gewünschte Effekt in der deutlich verminderten Proliferationsrate nach 48h unter Minimalserum und einer Verschiebung der Zellzyklusphasen von G0/G1 in die S-Phase unter Restimulation wider. Der (P)RR war in dieser Versuchsreihe unter 48h Minimalserum auf mRNA Ebene erhöht, wobei dies auf Proteinebene nicht bestätigt werden konnte (Abb 3.15). Bei einer relativ belastbaren Fallzahl (n=6) muss hier der kurze Beobachtungszeitraum von 48h bedacht werden, in dem eine etwaige spätere Proteinmengenänderung nicht nachgewiesen werden kann.
Im dritten Versuch dieser Reihe gelang es durch externe Laktatzufuhr in verschiedenen Konzentrationen eine verminderte Proliferationsrate nach 24h und 48h zu induzieren. Letztlich kann hier jedoch bei gegenläufigen Tendenzen der (P)RR Mengen auf mRNA und Protein-

ebene, und darüberhinaus den niedrigen Versuchszahlen, keine belastbare Aussage zum Einfluss der Laktatkonzentration auf den (P)RR getroffen werden.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene Ansätze der exogenen Manipulation eine verminderte Proliferationsrate der As4.1 Zellen induziert werden. Ohne eindeutige Tendenzen auf mRNA und Proteinebene kann, auch in Kombination mit den niedrigen Fallzahlen, kaum eine belastbare Aussage zur (P)RR Menge getroffen werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der schmale Grat zwischen messbarem Effekt und erhöhter Letalität auf eine sensitive Regulation des (P)RR hindeutet (Kinouchi, Ichihara et al. 2010, Oshima, Kinouchi et al. 2011, Wendling, Champy et al. 2017). Daher ist unabhängig vom Versuchsaufbau unter stabiler Zellvitalität, keine große Differenz der (P)RR Mengen zu erwarten.

In Kombination mit den (üblichen) niedrigen Fallzahlen bei quantitativen Nachweisen *in vitro*, wird eine belastbare statistische Anlayse der (P)RR Menge kaum möglich sein. Ein möglicher Ansatz für weiterführende Untersuchungen wäre jedoch die Lokalisation des (P)RR unter verschiedenen Kulturbedingungen zu beobachten oder die Auswirkungen auf mehrere Bestandteile eines Signalweges zu bestimmen. Durch die einleitend erwähnte bekannte Interaktion mit den Wnt-Signalwegen, der bekannten pro-proliferatorischen Wirkung des kanonischen und des diskutierten Einfluss' des Wnt-PCP auf den Zellzyklus, sowie womöglich ebenfalls Wnt-abhänginge Veränderungen des primären Ziliums, kämen hierfür die Wnt-Signalwege in Betracht.

4.3. Einfluss der (P)RR-*Downregulation* auf die Wnt-Pathways

Wie bereits einleitend dargestellt (s. Kapitel 1.2, Seite 8 ff.) und in vorherigen Arbeiten diskutiert (Sihn, Rousselle et al. 2010, Peters 2017), ist die Verbindung des (P)RR zu den Wnt Signalwegen unstrittig, wenngleich die Details nicht vollends aufgeklärt sind. Kurz zusammengefasst beschrieben Cruciat et al. den (P)RR als Ko-Rezeptor des kanonischen Wnt, der darüber hinaus die nachgeschalteten intrazellulären Vesikel ansäuert (Cruciat, Ohkawara et al. 2010). Für diese vesikuläre Funktion wird der (P)RR auch im Wnt-PCP benötigt, darüberhinaus ist er hier auch vermittelndes Kern-Protein (Hermle, Guida et al. 2013).

Die Verbindung der Wnt-Signalwege zum primären Zilium wurde von Gerdes et al. durch veränderte intrazelluläre Wnt-Antworten nach Basalkörperstörungen nachgewiesen. Eine Suppression der BBSome bildenden Transkripte (Bbs1, Bbs5, Bbs6) führte zu einer Stabilisierung des *β-Catenin* im kanonischen Wnt und einer vermehrten TCF/LEF Transkription. Des Weiteren wurde das primäre Zilium als Regulator zwischen kanonischem und PCP-Wnt Signalweg propagiert (Gerdes, Liu et al. 2007, Saito, Tampe et al. 2015). Wie durch Wallingford et al. diskutiert, konnte die wechselseitige Beziehung von exprimiertem Zilium bei reduziertem kanonischem Wnt reproduziert und eine ziliäre Interaktion mit dem Wnt-PCP Signalweg nachgewiesen werden. So wird der Wnt-PCP Signalweg zwar für die Funktion und die Orientierung diverser Zilienarten (Sterozilien, Haarfollickel, motile Zilien) benötigt, jedoch kann die zelluläre planare Asymetrie der Zelle auch ohne PCP-Funktion aufrechterhalten werden. Hierbei nehmen Wallingford et al. einen Zentrosom basierten- und mikrotubulär vermittelten Mechanismus an, welcher in engem Zusammenhang zum BBSome und ziliären Basalkörper steht (Wallingford and Mitchell 2011). In Zusammenschau dieser Arbeiten stellt sich übereinstimmend heraus, dass der kanonische Wnt-Signalweg unter Zilienexpression und gesteigerter BBSome Exprimierung vermindert ist (Gerdes, Liu et al. 2007, Wallingford and Mitchell 2011). Des Weiteren ist bereits im Vorfeld dargestellt worden, dass der kanonische Wnt-Signalweg den ziliären Abbau moduliert (Ke and Yang 2014), weshalb eine Einschränkung dessen zu vermehrter Zilienexpression und einem Zyklusarrest führen (Goto, Inoko et al. 2012, Niehrs and Acebron 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in As4.1 Zellen unter (P)RR *Downregulation* hingegen eine vermehrte Zilienexpression, eine verminderte Proliferationsrate und ein Zellzyklusarrest festgestellt. Obwohl unter dem induzierten Zyklusarrest eine verminderte pro-zyklische Regulation zu erwarten wäre, waren die Transkriptmengen von *Cyclin D1* und *Cyclin E1* signifikant erhöht.

Auf Seiten des kanonischen Wnt ist, entgegen der vorherigen Arbeiten, durch die Erhöhung von *Engrailed 2* und gleichzeitig konstanter GSK3 Menge eine Steigerung anzunehmen. Obwohl die isolierten Daten auf mRNA Ebene nur eingeschränkt belastbar sind, stellen sich daher die Fragen, ob der Zellzyklus durch den (P)RR unabhängig der Cycline gehemmt wird und weshalb der kanonische Wnt Signalweg hierunter vermehrt aktiv sein könnte.

Wegen eines ähnlichen Phänotypen von Wnt-PCP Fehlfunktion und BBS4 *knockout* wurde der *planar-cell-polarity* Signalweg mit dem primären Zilium in Verbindung gebracht, in dessen Konsequenz eine Lokalisation von *Vangl 2* am Basalkörper nachgewiesen wurde (Ross, May-Simera et al. 2005). Auch wenn die von Lee et al. propagierte Effektor Rolle von *Fuzzy* (unter (P)RR *Downregulation* unverändert) und *Inturned* im Wnt-PCP (Lee and Adler 2002) in Frage gestellt (Wallingford and Mitchell 2011) und darüber hinaus sowohl *Fuzzy* als auch *Inturned* mit weiteren Signalwegen (Park, Haigo et al. 2006) in Verbindung gebracht werden, sind beide Genprodukte für die Ziliogenese für die planare Polarität und Ziliogenese notwendig (Heydeck, Zeng et al. 2009, Zeng, Hoover et al. 2010, Heydeck and Liu 2011).
Unter (P)RR *Downregulation,* mit einhergehendem Zyklusarrest und vermehrter Zilienexpression, waren die Transkriptmengen von *Flamingo* und *Inturned* stellvertretend für den Wnt-PCP erhöht. Gerondopoulos et al. bestätigten die Notwendigkeit von *Inturned* in der Ziliogenese, und wiesen eine Lokalisation am Basalkörper nach (Gerondopoulos, Strutt et al. 2019). Das Transkript von *Fuzzy,* welches ebenfalls als Wnt-PCP Effektor fungiert und den ziliären Aufbau mit beeinflusst (Lee and Adler 2002, Zilber, Babayeva et al. 2013), blieb genau wie *Vangl 2* als zentraler Bestandteil des Wnt-PCP (Montcouquiol, Rachel et al. 2003) unter (P)RR *Downregulation* unverändert. Auf Basis dieser Daten kann insgesamt eine vermehrte Aktivität des Wnt-PCP vermutet werden, wenngleich dies auf Proteinebene bestätigt werden sollte.

Zusammengefasst zeigten sich unter (P)RR *Downregulation* in As4.1 Zellen vermehrte Transkriptmengen des kanonischen Wnt und des Wnt-PCP. Dies spricht gegen eine diskutierte binäre Schalterfunktion des primären Ziliums (Saito, Tampe et al. 2015) und wirft die Frage auf, inwiefern die verminderte Proliferationsrate und der nachgewiesene Zellzyklusarrest mit einer vermehrten pro-proliferativen kanonischen Wnt Aktivität (Niehrs and Acebron 2012) und den erhöhten *Cyclin D1 / E1* Mengen einhergehen kann. Diese Fragen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden, können aber die Grundlage für weiterführende Untersuchungen bilden.

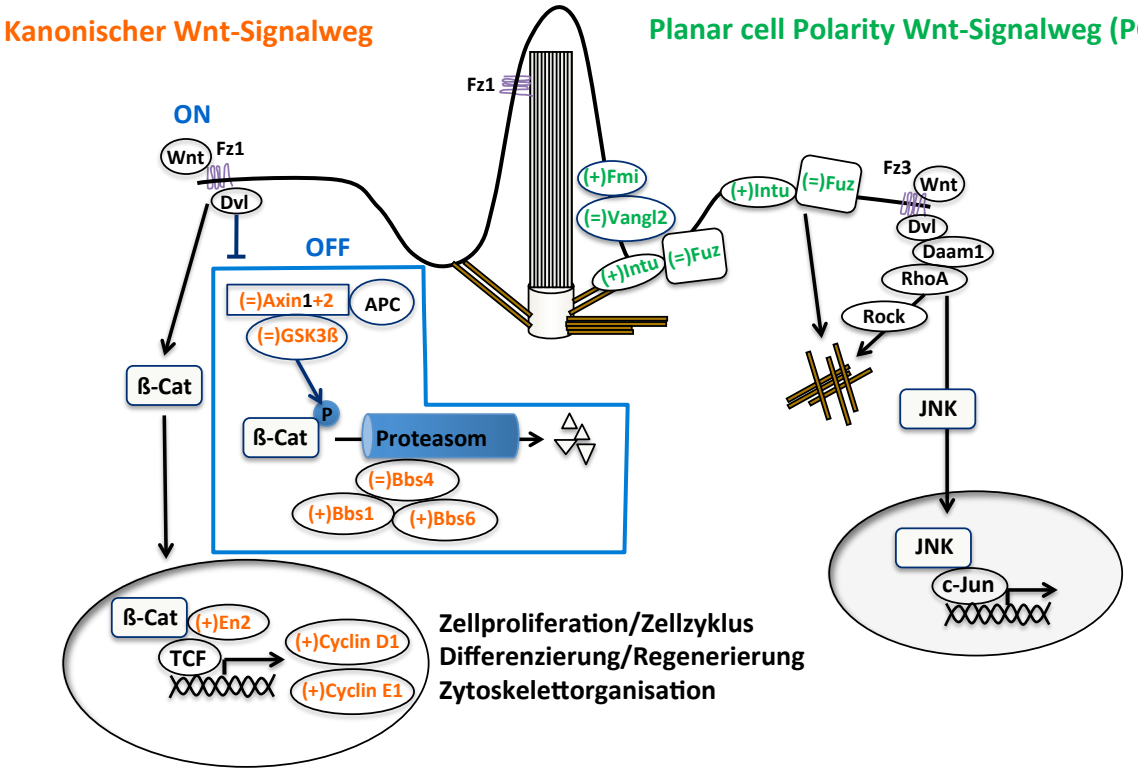


Abb 4.2 Schematische Darstellung der großen Wnt- Signalwege

Im den dargestellten kanonischen und Wnt-PCP Signalwegen sind die zuvor getesteten und diskutierten Transkripte mit der gemessenen mRNA Änderung unter (P)RR *Downregulation* dargestellt (=/+, *Frizzled* (Fz), *Engrailed* 2 (En2), *Flamingo* (Fmi), *Fuzzy* (Fuz), *Inturned* (Intu)(adaptiert aus Berbari, O'Connor et al. 2009))

Zusammenfassung

Der (Pro)Renin Rezeptor ((P)RR, auch ATP6ap2) wurde 2002 als membranständiges Protein entdeckt. Seitdem treten neben dem Renin-Angiotensinogen-Angiotensin System (RAAS) immer mehr Signalwege zu Tage, die von der Funktion des (P)RR abhängen. Hierzu zählen neben dem kanonischen Wnt – *pathway* und dem nicht kanonischen Wnt-PCP (*planar cell polarity*) auch ein Einfluss auf vesikuläre ATPasen und Transkriptonsfaktoren (PLZF Erk1/2). Wegen frühzeitig letaler Verläufe unter vollständiger (P)RR Elimination *in vivo* bleibt mit einer moderaten Verminderung der Expression (*Downregulation*) ein Weg, um die Relevanz und Beteiligung des Rezeptors weiter zu untersuchen. In der tumorösen renalen Zelllinie As4.1 wurde hierzu durch die AG Peters eine selektive (P)RR *Downregulation* etabliert. Die hierunter erfolgte unselektive Analyse des gesamten Transkriptoms zeigte 28 relevante Änderungen der Transkriptkonzentrationen, dessen zugehörige Genprodukte sich funktionell in zwei Gruppen teilen lassen. Einerseits waren mehrere Zilien assoziierte Transkripte nach (P)RR *Downregulation* erhöht, andererseits waren Zellzyklus assoziierte Transkripte vorrangig vermindert. Hieraus ergaben sich als Zielstellungen für die Arbeit:

1.) eine erneute gezielte und statisisch belastbare Überprüfung der zuvor veränderten Transkriptkozentrationen unter (P)RR *Downregulation*, 2.) eine funktionelle Untersuchung des Zusammenhangs von (P)RR zur ziliären Expression und dem Zellzyklus, 3.) die Analyse möglicher vermittelnder Signalwege.

Durch molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen, Flureszenszmikroskopie und FACS Analysen, wurden im Rahmen dieser Arbeit (ad 1) die Transkriptveränderungen bestätigt, (ad 2) eine relevant verminderte Proliferationsrate und ein Zellzyklusarrest, bei gleichzeitig erhöhter Expression des primären Ziliums unter (P)RR *Downregulation* nachgewiesen, sowie (ad 3) Transkriptmengen Steigerungen des kanonischen und Wnt-PCP gemessen.

Ohne Analyse der zugehörigen Proteinmengen lässt sich aus den Ergebnissen nur vorsichtig schlussfolgern, dass der (P)RR (ad 1) möglicherweise im Aufbau des primären Zilium und/oder in der Entstehung von Ziliopathien beteiligt ist, (ad 2) eine (P)RR *Downregulierung* den Zellzyklus protrahiert und die Expression des primären Ziliums verstärkt und (ad 3) die Wnt-Signalwege dies vermitteln könnten. Neben dem ausstehenden Nachweis auf Proteinebene wäre ein gezielter Vergleich von primärem Zilium (fast ubiquitär, Zellzyklus abhängige Expression) gegenüber den spezialisierten Zilien der symptomatischen Ziliopathien (Retinitis pigmentosa, Polyzystische Nierenerkrankung) interessant, wobei in der Einordnung der Ergebnisse die Sonderrolle der hier gewählten Zellkultur (As4.1, renale Tumorlinie) berücksichtigt werden muss.

Literaturverzeichnis

Advani, A., D. J. Kelly, A. J. Cox, K. E. White, S. L. Advani, K. Thai, K. A. Connelly, D. Yuen, J. Trogadis, A. M. Herzenberg, M. A. Kuliszewski, H. Leong-Poi and R. E. Gilbert (2009). "The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H+-ATPase in the kidney." Hypertension **54**(2): 261-269.

Amsterdam, A., R. M. Nissen, Z. Sun, E. C. Swindell, S. Farrington and N. Hopkins (2004). "Identification of 315 genes essential for early zebrafish development." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 12792-12797.

Asad, M., M. K. Wong, T. Z. Tan, M. Choolani, J. Low, S. Mori, D. Virshup, J. P. Thiery and R. Y. Huang (2014). "FZD7 drives in vitro aggressiveness in Stem-A subtype of ovarian cancer via regulation of non-canonical Wnt/PCP pathway." Cell Death Dis **5**: 1-11.

Aydogan, M. G., A. Wainman, S. Saurya, T. L. Steinacker, A. Caballe, Z. A. Novak, J. Baumbach, N. Muschalik and J. W. Raff (2018). "A homeostatic clock sets daughter centriole size in flies." J Cell Biol **217**(4): 1233-1248.

Balmer, S., A. Dussert, G. M. Collu, E. Benitez, C. Iomini and M. Mlodzik (2015). "Components of Intraflagellar Transport Complex A Function Independently of the Cilium to Regulate Canonical Wnt Signaling in Drosophila." Dev Cell **34**(6): 705-718.

Basu, B. and M. Brueckner (2008). "Cilia: Multifunctional organelles at the center of vertebrate left-right Asymmetry." Current Topics in Developmental Biology **85**: 151-174.

Benzing, T., M. Simons and G. Walz (2007). "Wnt signaling in polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol **18**(5): 1389-1398.

Benzing, T. and G. Walz (2006). "Cilium-generated signaling: a cellular GPS?" Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(3): 245-249.

Berbari, N. F., A. K. O'Connor, C. J. Haycraft and B. K. Yoder (2009). "The primary cilium as a complex signaling center." Curr Biol **19**(13): R526-535.

Beyenbach, K. W. and H. Wieczorek (2006). "The V-type H+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation." J Exp Biol **209**(Pt 4): 577-589.

Bilic, J., Y.-L. Huang, G. Davidson, T. Zimmermann, C.-M. Cruciat, M. Bienz and C. Niehrs (2007). "Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled- Dependent LRP6 Phosporylation." Science **316**: 1619-1622.

Blacque, O. E., M. J. Reardon, C. Li, J. MCCarthy, M. R. Mahjoub, S. J. Ansley, J. L. Baduano, A. K. Mah, P. L. Beales, W. S. Davidson, R. C. Johnsen, M. Audeh, R. H. A. Plasterk, D. L. Baillie, N. Katsanis, L. M. Quarmby, S. R. Wicks and M. R. Leroux (2004). "Loss of C. elegans BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport." Gene & Development **18**: 1630-1642.

Bryja, V., I. Cervenka and L. Cajanek (2017). "The connections of Wnt pathway components with cell cycle and centrosome: side effects or a hidden logic?" Crit Rev Biochem Mol Biol **52**(6): 614-637.

Burckle, C. and M. Bader (2006). "Prorenin and its ancient receptor." Hypertension **48**(4): 549-551.

Buselmaier, W. (2009). "Zellzyklus und Zellteilung, Kapitel 4 Biologie für Mediziner." Springer- Verlag Berlin Heidelberg **ISBN 978-3-642-00451-3**: 57-69.

Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." Cell **149**(6): 1192-1205.

Corbit, K. C., A. E. Shyer, W. E. Dowdle, J. Gaulden, V. Singla, M. H. Chen, P. T. Chuang and J. F. Reiter (2008). "Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms." Nat Cell Biol **10**(1): 70-76.

Cousin, C., D. Bracquart, A. Contrepas, P. Corvol, L. Muller and G. Nguyen (2009). "Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma." Hypertension **53**(6): 1077-1082.

Cruciat, C. M., B. Ohkawara, S. P. Acebron, E. Karaulanov, C. Reinhard, D. Ingelfinger, M. Boutros and C. Niehrs (2010). "Requirement of prorenin receptor and vacuolar H+-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling." Science **327**(5964): 459-463.

Danser, A. H. (2015). "The Role of the (Pro)renin Receptor in Hypertensive Disease." Am J Hypertens **28**(10): 1187-1196.

Daulat, A. M. and J. P. Borg (2017). "Wnt/Planar Cell Polarity Signaling: New Opportunities for Cancer Treatment." Trends Cancer **3**(2): 113-125.

de Paula, R. M., T. M. Lamb, L. Bennett and D. Bell-Pedersen (2008). "A connection between MAPK pathways and circadian clocks." Cell Cycle **7**(17): 2630-2634.

Forsythe, E. and P. L. Beales (2013). "Bardet-Biedl syndrome." Eur J Hum Genet **21**(1): 8-13.

Garcia-Gonzalo, F. R. and J. F. Reiter (2017). "Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition." Cold Spring Harb Perspect Biol **9**(2): 1-20.

Gerdes, J. M., Y. Liu, N. A. Zaghloul, C. C. Leitch, S. S. Lawson, M. Kato, P. A. Beachy, P. L. Beales, G. N. DeMartino, S. Fisher, J. L. Badano and N. Katsanis (2007). "Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response." Nat Genet **39**(11): 1350-1360.

Gerondopoulos, A., H. Strutt, N. L. Stevenson, T. Sobajima, T. P. Levine, D. J. Stephens, D. Strutt and F. A. Barr (2019). "Planar Cell Polarity Effector Proteins Inturned and Fuzzy Form a Rab23 GEF Complex." Curr Biol **29**(19): 3323-3330 e3328.

Goldsmith, C. S. and D. Bell-Pedersen (2013). "Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks." Adv Genet **84**: 1-39.

Goto, H., A. Inoko and M. Inagaki (2012). "Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells." Cellular and Molecular Life Sciences **70**(3893-3905): 3893.

Gubb, D. and A. Garcia-Bellido (1982). "A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in Drosophila melanogaster." J Embryol. exp. Morph. **68**: 37-57.

Gürster, S. (2013). "Intrazellulärer Transport von Zilium-assoziierten Proteinen." Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin- der Universität Regensburg: 6-14.

He, W., C. Dai, Y. Li, G. Zeng, S. P. Monga and Y. Liu (2009). "Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis." J Am Soc Nephrol **20**(4): 765-776.

Hermle, T., M. C. Guida, S. Beck, S. Helmstadter and M. Simons (2013). "Drosophila ATP6AP2/VhaPRR functions both as a novel planar cell polarity core protein and a regulator of endosomal trafficking." EMBO J **32**(2): 245-259.

Hermle, T., D. Saltukoglu, J. Grunewald, G. Walz and M. Simons (2010). "Regulation of Frizzled-dependent planar polarity signaling by a V-ATPase subunit." Curr Biol **20**(14): 1269-1276.

Heydeck, W. and A. Liu (2011). "PCP effector proteins inturned and fuzzy play nonredundant roles in the patterning but not convergent extension of mammalian neural tube." Dev Dyn **240**(8): 1938-1948.

Heydeck, W., H. Zeng and A. Liu (2009). "Planar cell polarity effector gene Fuzzy regulates cilia formation and Hedgehog signal transduction in mouse." Dev Dyn **238**(12): 3035-3042.

Hildebrandt, F., M. Attanasio and E. Otto (2009). "Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy." J Am Soc Nephrol **20**(1): 23-35.

Huang, Y., S. Wongamorntham, J. Kasting, D. McQuillan, R. T. Owens, L. Yu, N. A. Noble and W. Border (2006). "Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms." Kidney Int **69**(1): 105-113.

Ichihara, A., M. Hayashi, Y. Kaneshiro, F. Suzuki, T. Nakagawa, Y. Tada, Y. Koura, A. Nishiyama, H. Okada, M. N. Uddin, A. H. M. N. Nabi, Y. Ishida, T. Inagami and T. Saruta (2004). "Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the “handle” region for nonproteolytic activation of prorenin." Journal of Clinical Investigation **114**(8): 1128-1135.

Ichihara, A., F. Suzuki, T. Nakagawa, Y. Kaneshiro, T. Takemitsu, M. Sakoda, A. H. Nabi, A. Nishiyama, T. Sugaya, M. Hayashi and T. Inagami (2006). "Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice." J Am Soc Nephrol **17**(7): 1950-1961.

Jho, E. h., T. Zhang, C. Domon, C. K. Joo, J. N. Freund and F. Costantini (2002). "Wnt/ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway." Molecular and Cellular Biology **22**(4): 1172-1183.

Jiang, J., K. Promchan, H. Jiang, P. Awasthi, H. Marshall, A. Harned and V. Natarajan (2016). "Depletion of BBS Protein LZTFL1 Affects Growth and Causes Retinal Degeneration in Mice." J Genet Genomics **43**(6): 381-391.

Jin, H. and M. V. Nachury (2009). "The BBSome." Curr Biol **19**(12): R472-473.

Kanda, A., K. Noda and S. Ishida (2015). "ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit." J Biol Chem **290**(15): 9690-9700.

Ke, Y. N. and W. X. Yang (2014). "Primary cilium: an elaborate structure that blocks cell division?" Gene **547**(2): 175-185.

Kim, H., Y. J. Choi, Y. S. Lee, S. Y. Park, J. E. Baek, H. K. Kim, B. J. Kim, S. H. Lee and J. M. Koh (2018). "SLIT3 regulates endochondral ossification by beta-catenin suppression in chondrocytes." Biochem Biophys Res Commun **506**(4): 847-853.

Kinouchi, K., A. Ichihara, M. Sano, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, A. Kurauchi-Mito, K. Bokuda, T. Narita, Y. Oshima, M. Sakoda, Y. Tamai, H. Sato, K. Fukuda and H. Itoh (2010). "The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H+-ATPase assembly in murine cardiomyocytes." Circ Res **107**(1): 30-34.

Kirsch, S., E. Schrezenmeier, S. Klare, D. Zaade, K. Seidel, J. Schmitz, S. Bernhard, D. Lauer, M. Slack, P. Goldin-Lang, T. Unger, F. S. Zollmann and H. Funke-Kaiser (2014). "The (pro)renin receptor mediates constitutive PLZF-independent pro-proliferative effects which are inhibited by bafilomycin but not genistein." Int J Mol Med **33**(4): 795-808.

Korvatska, O., N. S. Strand, J. D. Berndt, T. Strovas, D. H. Chen, J. B. Leverenz, K. Kiianitsa, I. F. Mata, E. Karakoc, J. L. Greenup, E. Bonkowski, J. Chuang, R. T. Moon, E. E. Eichler, D. A. Nickerson, C. P. Zabetian, B. C. Kraemer, T. D. Bird and W. H. Raskind (2013). "Altered splicing of ATP6AP2 causes X-linked parkinsonism with spasticity (XPDS)." Hum Mol Genet **22**(16): 3259-3268.

L. Lynn Mc Grew, K.-I. T., Rebecca Bates, Randall T. Moon (1999). "Direct regulation of the Xenopus engraile-2 promotor by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in Xenopus." Mechanisms of Development **87**: 21-32.

Lee, H. and P. N. Adler (2002). "The function of the frizzled Pathways in the Drosophila Wing is dependent on Inturned and Fuzzy." Genetics **160**: 1535-1547.

Lee, H. J., D. L. Shi and J. J. Zheng (2015). "Conformational change of Dishevelled plays a key regulatory role in the Wnt signaling pathways." Elife **4**: e08142.

Leung, T., X.-Q. Chen, E. Manser and L. Lim (1996). "The p160 RhoA-Binding Kinase ROKα Is a Member of a Kinase Family and Is Involved in the Reorganization of the Cytoskeleton." Molecular and Cellular Biology **16**: 5313-5327.

Lin, F., T. Hiesberger, K. Cordes, A. M. Sinclair, L. S. Goldstein, S. Somlo and P. Igarashi (2003). "Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5286-5291.

Liu, P., Y. K. Choi and R. Z. Qi (2014). "NME7 is a functional component of the gamma-tubulin ring complex." Mol Biol Cell **25**(13): 2017-2025.

Ludwig, J., S. Kerscher, U. Brandt, K. Pfeiffer, F. Getlawi, D. K. Apps and H. Schägger (1998). "Identification and Characterization of a Novel 9.2-kDa Membrane Sector-associated Protein of Vacuolar Proton-ATPase from Chromaffin Granules." The Journal of Biological Chemistry **273**: 10939-10947.

Luyten, A., X. Su, S. Gondela, Y. Chen, S. Rompani, A. Takakura and J. Zhou (2010). "Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol **21**(9): 1521-1532.

MacDonald, B. T., K. Tamai and X. He (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." Dev Cell **17**(1): 9-26.

Madhivanan, K. and R. C. Aguilar (2014). "Ciliopathies: the trafficking connection." Traffic **15**(10): 1031-1056.

Marshansky, V. and M. Futai (2008). "The V-type H+-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function." Curr Opin Cell Biol **20**(4): 415-426.

Matsu-Ura, T., S. R. Moore and C. I. Hong (2018). "WNT Takes Two to Tango: Molecular Links between the Circadian Clock and the Cell Cycle in Adult Stem Cells." J Biol Rhythms **33**(1): 5-14.

Methot, D., D. W. Silversides and T. L. Reudelhuber (1999). "In Vivo Enzymatic Assay Reveals Catalytic Activity of the Human Renin Precursor in Tissues." Circ Res **84**: 1067-1072.

Montcouquiol, M., R. A. Rachel, P. J. Lanford, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and M. W. Kelley (2003). "Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals." Nature **423**(6936): 173-177.

Moorman, S. J. and A. Z. Shorr (2008). "The primary cilium as a gravitational force transducer and a regulator of transcriptional noise." Dev Dyn **237**(8): 1955-1959.

Morch, A. (2019). "Die Lokalisation des (Pro)Reninrezeptors in renalen, kardialen und neuronalen Zellen und Geweben sowie seine Funktion als akzessorisches Protein ATP6ap2 der vakuolären H+-ATPase." Dissertation an der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald: 29-53.

Morgan, D., L. Eley, J. Sayer, T. Strachan, L. M. Yates, A. S. Craighead and J. A. Goodship (2002). "Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle." Hum Mol Genet **11**(26): 3345-3350.

Mourao, A., A. R. Nager, M. V. Nachury and E. Lorentzen (2014). "Structural basis for membrane targeting of the BBSome by ARL6." Nat Struct Mol Biol **21**(12): 1035-1041.

Nakayama, K. and Y. Katoh (2018). "Ciliary protein trafficking mediated by IFT and BBSome complexes with the aid of kinesin-2 and dynein-2 motors." J Biochem **163**(3): 155-164.

Nguyen, G. (2011). "Renin, (pro)renin and receptor: an update." Clin Sci (Lond) **120**(5): 169-178.

Nguyen, G. and A. H. Danser (2008). "Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents." Exp Physiol **93**(5): 557-563.

Nguyen, G., F. Delarue, C. Burcklé, L. Bouzhir, T. Giller and J.-D. Sraer (2002). "Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin." Journal of Clinical Investigation **109**(11): 1417-1427.

Nguyen, G. and D. N. Muller (2009). "The Biology of the (Pro)Renin Receptor." Journal of the American Society of Nephrology **21**(1): 18-23.

Niehrs, C. (2010). "On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes." Development **137**(6): 845-857.

Niehrs, C. and S. P. Acebron (2012). "Mitotic and mitogenic Wnt signalling." EMBO J **31**(12): 2705-2713.

Oshima, Y., K. Kinouchi, A. Ichihara, M. Sakoda, A. Kurauchi-Mito, K. Bokuda, T. Narita, H. Kurosawa, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, T. Yamada, M. Takemoto, M. A. Saleem, S. E. Quaggin and H. Itoh (2011). "Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function." J Am Soc Nephrol **22**(12): 2203-2212.

Pan, J., Q. Wang and W. J. Snell (2005). "Cilium-generated signaling and cilia-related disorders." Lab Invest **85**(4): 452-463.

Park, T. J., S. L. Haigo and J. B. Wallingford (2006). "Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling." Nat Genet **38**(3): 303-311.

Park, T. J., B. J. Mitchell, P. B. Abitua, C. Kintner and J. B. Wallingford (2008). "Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells." Nat Genet **40**(7): 871-879.

Peters, J. (2017). "The (pro)renin receptor and its interaction partners." Pflugers Arch **469**(10): 1245-1256.

Phillips, C. L., K. J. Miller, A. J. Filson, J. Nurnberger, J. L. Clendenon, G. W. Cook, K. W. Dunn, P. A. Overbeek, V. H. Gattone, 2nd and R. L. Bacallao (2004). "Renal cysts of inv/inv mice resemble early infantile nephronophthisis." J Am Soc Nephrol **15**(7): 1744-1755.

Phua, S. C., Y. C. Lin and T. Inoue (2015). "An intelligent nano-antenna: Primary cilium harnesses TRP channels to decode polymodal stimuli." Cell Calcium **58**(4): 415-422.

Plotnikova, O. V., E. Pugacheva and E. A. Golemis (2009). "Primary Cilia and the Cell Cycle." Methods Cell Biol. **94**: 137-160.

Pulkkinen, K., S. Murugan and S. Vainio (2008). "Wnt signaling in kidney development and disease." Organogenesis **4**(2): 55-59.

Puvirajesinghe, T. M., F. Bertucci, A. Jain, P. Scerbo, E. Belotti, S. Audebert, M. Sebbagh, M. Lopez, A. Brech, P. Finetti, E. Charafe-Jauffret, M. Chaffanet, R. Castellano, A. Restouin, S. Marchetto, Y. Collette, A. Goncalves, I. Macara, D. Birnbaum, L. Kodjabachian, T. Johansen and J. P. Borg (2016). "Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2-JNK signalling in breast cancer." Nat Commun **7**: 10318.

Rademaker, M. T., T. G. Yandle, L. J. Ellmers, C. J. Charles, M. G. Nicholls and A. M. Richards (2012). "Hemodynamic, hormonal, and renal effects of (pro)renin receptor blockade in experimental heart failure." Circ Heart Fail **5**(5): 645-652.

Raynaud-Messina, B. and A. Merdes (2007). "Gamma-tubulin complexes and microtubule organization." Curr Opin Cell Biol **19**(1): 24-30.

Rieder, C. L., C. G. Jensen and L. C. W. Jensen (1979). "The resorption of primary cilia during mitosis in a Vertebrate (Ptk1)." Journal of Ultrastructure Research **68**: 173-185.

Riediger, F., I. Quack, F. Qadri, B. Hartleben, J. K. Park, S. A. Potthoff, D. Sohn, G. Sihn, A. Rousselle, V. Fokuhl, U. Maschke, B. Purfurst, W. Schneider, L. C. Rump, F. C. Luft, R. Dechend, M. Bader, T. B. Huber, G. Nguyen and D. N. Muller (2011). "Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival." J Am Soc Nephrol **22**(12): 2193-2202.

Rodrigues-Martins, A., M. Riparbelli, G. Callaini, D. M. Glover and M. Bettencourt-Dias (2007). "Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis." Science **316**(5827): 1046-1050.

Roskoski, R., Jr. (2012). "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation." Pharmacol Res **66**(2): 105-143.

Ross, A. J., H. May-Simera, E. R. Eichers, M. Kai, J. Hill, D. J. Jagger, C. C. Leitch, J. P. Chapple, P. M. Munro, S. Fisher, P. L. Tan, H. M. Phillips, M. R. Leroux, D. J. Henderson, J. N. Murdoch, A. J. Copp, M. M. Eliot, J. R. Lupski, D. T. Kemp, H. Dollfus, M. Tada, N. Katsanis, A. Forge and P. L. Beales (2005). "Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates." Nat Genet **37**(10): 1135-1140.

Rosso, S. B., D. Sussman, A. Wynshaw-Boris and P. C. Salinas (2005). "Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development." Nat Neurosci **8**(1): 34-42.

Rousselle, A., G. Sihn, M. Rotteveel and M. Bader (2014). "(Pro)renin receptor and V-ATPase: from Drosophila to humans." Clin Sci (Lond) **126**(8): 529-536.

Saburi, S., I. Hester, E. Fischer, M. Pontoglio, V. Eremina, M. Gessler, S. E. Quaggin, R. Harrison, R. Mount and H. McNeill (2008). "Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease." Nat Genet **40**(8): 1010-1015.

Saito, S., B. Tampe, G. A. Muller and M. Zeisberg (2015). "Primary cilia modulate balance of canonical and non-canonical Wnt signaling responses in the injured kidney." Fibrogenesis Tissue Repair **8**: 1-11.

Salameh, A., A. K. Lee, M. Cardo-Vila, D. N. Nunes, E. Efstathiou, F. I. Staquicini, A. S. Dobroff, S. Marchio, N. M. Navone, H. Hosoya, R. C. Lauer, S. Wen, C. C. Salmeron, A. Hoang, I. Newsham, L. A. Lima, D. M. Carraro, S. Oliviero, M. G. Kolonin, R. L. Sidman, K. A. Do, P. Troncoso, C. J. Logothetis, R. R. Brentani, G. A. Calin, W. K. Cavenee, E. Dias-Neto, R. Pasqualini and W. Arap (2015). "PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(27): 8403-8408.

Saris, J. J., P. A. t Hoen, I. M. Garrelds, D. H. Dekkers, J. T. den Dunnen, J. M. Lamers and A. H. Jan Danser (2006). "Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II." Hypertension **48**(4): 564-571.

Schäfer, S. (2014). "ATP6AP2 is critically involved in adult hippocampal neurogenesis and reveals stage-specific functions for Wnt/ß-Catenin and Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) signaling." Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Universität der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald: 37-68.

Schefe, J. H., M. Menk, J. Reinemund, K. Effertz, R. M. Hobbs, P. P. Pandolfi, P. Ruiz, T. Unger and H. Funke-Kaiser (2006). "A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein." Circ Res **99**(12): 1355-1366.

Schiebel, E. (2000). "Gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 113-118.

Schmidt-Ott, K. M. and J. Barasch (2008). "WNT/beta-catenin signaling in nephron progenitors and their epithelial progeny." Kidney Int **74**(8): 1004-1008.

Seo, S., L. M. Baye, N. P. Schulz, J. S. Beck, Q. Zhang, D. C. Slusarski and V. C. Sheffield (2010). "BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1488-1493.

Sihn, G., A. Rousselle, L. Vilianovitch, C. Burckle and M. Bader (2010). "Physiology of the (pro)renin receptor: Wnt of change?" Kidney Int **78**(3): 246-256.

Simons, M., J. Gloy, A. Ganner, A. Bullerkotte, M. Bashkurov, C. Kronig, B. Schermer, T. Benzing, O. A. Cabello, A. Jenny, M. Mlodzik, B. Polok, W. Driever, T. Obara and G. Walz (2005). "Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways." Nat Genet **37**(5): 537-543.

Simons, M. and M. Mlodzik (2008). "Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease." Annu Rev Genet **42**: 517-540.

Steinhart, Z. and S. Angers (2018). "Wnt signaling in development and tissue homeostasis." Development **145**(11).

Suliman, B. A., D. Xu and B. R. Williams (2012). "The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology." Front Oncol **2**: 1-12.

Susic, D., X. Zhou, E. D. Frohlich, H. Lippton and M. Knight (2008). "Cardiovascular effects of prorenin blockade in genetically spontaneously hypertensive rats on normal and high-salt diet." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(3): H1117-H1121.

Tada, M. and M. Kai (2009). "Noncanonical Wnt/PCP signaling during vertebrate gastrulation." Zebrafish **6**(1): 29-40.

Takahashi, H., A. Ichihara, Y. Kaneshiro, K. Inomata, M. Sakoda, T. Takemitsu, A. Nishiyama and H. Itoh (2007). "Regression of nephropathy developed in diabetes by (Pro)renin receptor blockade." J Am Soc Nephrol **18**(7): 2054-2061.

Tani, Y., S. Yamada, N. Inoshita, Y. Hirata and M. Shichiri (2015). "Regulation of growth hormone secretion by (pro)renin receptor." Sci Rep **5**: 10878.

Valente, E. M., C. V. Logan, S. Mougou-Zerelli, J. H. Lee, J. L. Silhavy, F. Brancati, M. Iannicelli, L. Travaglini, S. Romani, B. Illi, M. Adams, K. Szymanska, A. Mazzotta, J. E. Lee, J. C. Tolentino, D. Swistun, C. D. Salpietro, C. Fede, S. Gabriel, C. Russ, K. Cibulskis, C. Sougnez, F. Hildebrandt, E. A. Otto, S. Held, B. H. Diplas, E. E. Davis, M. Mikula, C. M. Strom, B. Ben-Zeev, D. Lev, T. L. Sagie, M. Michelson, Y. Yaron, A. Krause, E. Boltshauser, N. Elkhartoufi, J. Roume, S. Shalev, A. Munnich, S. Saunier, C. Inglehearn, A. Saad, A. Alkindy, S. Thomas, M. Vekemans, B. Dallapiccola, N. Katsanis, C. A. Johnson, T. Attie-Bitach and J. G. Gleeson (2010). "Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes." Nat Genet **42**(7): 619-625.

Veemann, M. T., J. D. Axelrod and R. T. Moon (2003). "A Second Canon: Functions and Mechanisms of β- Catenin-Independent Wnt Signaling." Developmental Cell **5**: 367-377.

Vuong, L. T., C. Iomini, S. Balmer, D. Esposito, S. A. Aaronson and M. Mlodzik (2018). "Kinesin-2 and IFT-A act as a complex promoting nuclear localization of beta-catenin during Wnt signalling." Nat Commun **9**(1): 1-16.

Wallingford, J. B. and B. Mitchell (2011). "Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia." Genes Dev **25**(3): 201-213.

Wang, J. M., F. C. Huang, M. H. Kuo, Z. F. Wang, T. Y. Tseng, L. C. Chang, S. J. Yen, T. C. Chang and J. J. Lin (2014). "Inhibition of cancer cell migration and invasion through suppressing the Wnt1-mediating signal pathway by G-quadruplex structure stabilizers." J Biol Chem **289**(21): 14612-14623.

Wang, L. and B. D. Dynlacht (2018). "The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease." Development **145**(18): 1-18.

Wanka, H., P. Lutze, D. Staar, B. Peters, A. Morch, L. Vogel, R. K. Chilukoti, G. Homuth, J. Sczodrok, I. Baumgen and J. Peters (2017). "(Pro)renin receptor (ATP6AP2) depletion arrests As4.1 cells in the G0/G1 phase thereby increasing formation of primary cilia." J Cell Mol Med: 1-17.

Wendling, O., M. F. Champy, S. Jaubert, G. Pavlovic, A. Dubos, L. Lindner, H. Jacobs, M. Mark, R. Combe, I. G. Da Cruz, H. Luche, J. S. Mudgett, T. Rosahl, T. Sorg, M. Malissen, P. T. Reilly and Y. Herault (2017). "Atp6ap2 ablation in adult mice impairs viability through multiple organ deficiencies." Sci Rep **7**(1): 1-17.

Wiens, C. J., Y. Tong, M. A. Esmail, E. Oh, J. M. Gerdes, J. Wang, W. Tempel, J. B. Rattner, N. Katsanis, H. W. Park and M. R. Leroux (2010). "Bardet-Biedl syndrome-associated small GTPase ARL6 (BBS3) functions at or near the ciliary gate and modulates Wnt signaling." J Biol Chem **285**(21): 16218-16230.

Wilson, N. F. and P. A. Lefebvre (2004). "Regulation of flagellar assembly by glycogen synthase kinase 3 in Chlamydomonas reinhardtii." Eukaryot Cell **3**(5): 1307-1319.

Yan, Y., N. Denef and T. Schupbach (2009). "The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in Drosophila." Dev Cell **17**(3): 387-402.

Yang, W., L. Garrett, D. Feng, G. Elliott, X. Liu, N. Wang, Y. M. Wong, N. T. Choi, Y. Yang and B. Gao (2017). "Wnt-induced Vangl2 phosphorylation is dose-dependently required for planar cell polarity in mammalian development." Cell Res **27**(12): 1466-1484.

Yang, Y. and M. Mlodzik (2015). "Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt)." Annu Rev Cell Dev Biol **31**: 623-646.

Yeyati, P. L., R. Shaknovich, S. Boterashvili, J. Li, H. J. Ball, S. Waxman, K. Nason-Burchenal, E. Dmitrovsky, A. Zelent and J. D. Licht (1999). "Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A." Oncogene **18**(4): 925-934.

Zeng, H., A. N. Hoover and A. Liu (2010). "PCP effector gene Inturned is an important regulator of cilia formation and embryonic development in mammals." Dev Biol **339**(2): 418-428.

Zeng, X. T., Keiko; Doble, Brad; Li, Shitao; Huang, He; Habas, Raymond; Okamura, Heidi; Woodgett, Jim; He, Xi (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phoyphorylation and activation." Nature **438**: 873-877.

Zhang, C., H. Guo, B. Li, C. Sui, Y. Zhang, X. Xia, Y. Qin, L. Ye, F. Xie, H. Wang, M. Yuan, L. Yuan and J. Ye (2015). "Effects of Slit3 silencing on the invasive ability of lung carcinoma A549 cells." Oncol Rep **34**(2): 952-960.

Zhang, J., N. A. Noble, W. A. Border, R. T. Owens and Y. Huang (2008). "Receptor-dependent prorenin activation and induction of PAI-1 expression in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(4): E810-819.

Zhang, Q., D. Yu, S. Seo, E. M. Stone and V. C. Sheffield (2012). "Intrinsic protein-protein interaction-mediated and chaperonin-assisted sequential assembly of stable bardet-biedl syndrome protein complex, the BBSome." J Biol Chem **287**(24): 20625-20635.

Zhu, W., Z. Li, L. Xiong, X. Yu, X. Chen and Q. Lin (2017). "FKBP3 Promotes Proliferation of Non-Small Cell Lung Cancer Cells through Regulating Sp1/HDAC2/p27." Theranostics **7**(12): 3078-3089.

Zilber, Y., S. Babayeva, J. H. Seo, J. J. Liu, S. Mootin and E. Torban (2013). "The PCP effector Fuzzy controls cilial assembly and signaling by recruiting Rab8 and Dishevelled to the primary cilium." Mol Biol Cell **24**(5): 555-565.